Immunchemische Untersuchungen über die Rhesus-Blutgruppe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt

von

Inge Grundke
aus
Osnabrück

Göttingen 1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0052

Immunchemische Untersuchungen über die Rhesus-Blutgruppe

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt

von

Inge Grundke

aus

Osnabrück

Göttingen 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. rer. nat. G. Birukow

Korreferent: Prof. Dr. med. H. J. Deuticke

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 2. 1967

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite:
Verzeichnis der im Text gebrauchten Abkürzungen	IV
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	9
I. Serologische Methoden	9
1. Material	10
2. Methoden in vitro	12
3. Methoden in vivo	20
II. Präparation der Hemmstoffe	22
1. Präparation der Lipide aus Erythrozyten	22
2. Präparation des "Phenolwasserextraktes" (PWE) aus Erythrozyten	23
III. Chemische Analysen	24
1. Ultraviolett-Spektren	24
2. Bestimmung des Aschegehaltes und von Kationen	24
3. Phosphorbestimmung	24
4. Stickstoffbestimmung	25
5. Zuckerbestimmung	25
6. Aminozuckerbestimmung	27
7. Neuraminsäurebestimmung	27
8. Hämoglobinbestimmung	28
9. Qualitative Analysen	29

Seite:

IV. Verhalten der "Phenolwasserextrakte" gegenüber chemischen und physikalischen Einwirkungen 30
1. Auftrennung mit Hilfe von Wasser 30
2. Auftrennung durch Dialyse 30
3. Auftrennung durch Elektrodialyse 31
4. Behandlung mit Ultraschall 31
5. Thermostabilität 31
6. Saure Hydrolyse 32
7. Oxydation mit Perjodat 32

V. Versuche mit Modellsubstanzen 33
1. Verwendete Modellsubstanzen 33
2. Hydrolyse der Carboxymethylcellulose (CMC) 33
3. Methylierung von Carboxymethylcellulose 34
4. Bestimmung der Viskosität 35

C. ERGEBNISSE 36

I. Untersuchung der Totallipide 36
1. Wirkung der nach BLOOR extrahierten Totallipide 36
2. Wirkung der nach CARTER extrahierten Totallipide 40

II. Untersuchung der "Phenolwasserextrakte" (PWE) und ihrer Wirkung 41
1. Chemische und physikalische Eigenschaften 41
2. Versuche in vivo 43
3. Versuche im Hämagglutinationshemmtest 46

Seite:

4. Versuche im Absorptionstest 53
5. Versuche im Agar-Gel-Diffusionstest 54
6. Versuche mit chemisch und physikalisch verändertem "Phenolwasserextrakt" (PWE) 55

III. Untersuchung von Modellsubstanzen 65
1. Hämagglutinationshemmende Wirkung 65
2. Wirkung im Agar-Gel-Diffusionstest 68
3. Wirkung der Carboxymethylcellulose (CMC) am immunisierten Tier in vivo 70

D. DISKUSSION 72

I. Diskussion der serologischen Methoden 72
1. Versuche in vivo 72
2. Versuche in vitro 75

II. Diskussion der Ergebnisse 76
1. Versuche mit dem Totallipid aus Erythrozyten 77
2. Versuche mit dem "Phenolwasserextrakt" (PWE) aus Erythrozyten und mit Modellsubstanzen 79

E. ZUSAMMENFASSUNG 85

F. LITERATURVERZEICHNIS 87

VERZEICHNIS

der im Text gebrauchten Abkürzungen

ABO	=	"klassische" Blutgruppen des Menschen.
$\varkappa_H$	=	Hemmwert (Erläuterung s. S. 15).
CMC	=	Carboxymethylcellulose.
PWE	=	Phenolwasserextrakt (Erläuterung s. S. 8 und 23).
Rh	=	Rh-Blutgruppe (Rhesusfaktor).
rh	=	Abwesenheit der Rh-Blutgruppe.
TBZ	=	Titerbewertungszahl (Erläuterung s. S. 14/15).

A. EINLEITUNG

Schon seit der Entdeckung des Blutkreislaufs durch HARVEY (1628) hat man in Unkenntnis der biologischen Differenziertheit des Blutes versucht, Blutübertragungen vom Tier auf den Menschen vorzunehmen. Erst 1875 erkannte LANDOIS, daß diese Versuche wegen der Artspezifität des Blutes mit Sicherheit zum Scheitern verurteilt waren. Zu dieser Zeit waren bereits die Grundlagen der bakteriellen Immunitätslehre erarbeitet worden, und so führten systematische Versuche von LANDOIS bald zu der Erkenntnis, daß die Unverträglichkeit einer Blutübertragung von einer Tierart auf eine andere auf einem immunologischen Vorgang beruht, und zwar letztlich auf der Antigennatur des artfremden Blutes.

In der Immunitätslehre bezeichnet man als Antigen einen Stoff, der nach parenteraler Injektion bei einem Versuchstier die Bildung von spezifischen Antikörpern auslöst, die nach einigen Tagen im Blutserum des Versuchstieres nachgewiesen werden können. Antigene sind stets hochmolekulare Stoffe, und zwar Proteine oder Polysaccharide (HEIDELBERGER 1958; WESTPHAL u. a. 1952 a, 1952 b); sie müssen in ihrer chemischen Struktur von der der individuellen Baustoffe des Versuchstieres verschieden sein. Antikörper sind stets Proteine und finden sich in der Gruppe der γ-Serumglobuline. Ihr Nachweis kann in vitro durch eine chemische Reaktion mit dem entsprechenden Antigen erfolgen. Der Antikörper ist spezifisch auf das Antigen eingestellt; d. h. er reagiert nur mit demjenigen Antigen, das seine Bildung hervorgerufen hat. Geringfügige Änderungen in bestimmten Bezirken des Antigen-Moleküls (z. B. Konfigurationsänderungen) führen meist zu einem Verlust der Reaktionsfähigkeit mit dem Antikörper. Die Spezifität der Antikörper ist also meist eine sehr große.

Zum Nachweis von Antikörpern benutzt man meist eine "Präzipitation", d. h. die Bildung einer schwerlöslichen Antigen-Antikörper-Verbindung. In vielen Fällen kann man die Präzipitation im Agar-Gel-Diffusionstest (S.18) sichtbar machen. Liegt das Antigen zellgebunden (z. B. an der Oberfläche von Bakterien oder Erythrozyten) vor, so erfolgt eine Präzipitation an der Zelloberfläche, die infolge von Vernetzungen zur Zusammenballung (Agglutination) der Zellen führt; die Agglutination von Erythrozyten nennt man Hämagglutination.

Erythrozyten (natürlich auch andere Zellen) der Tierart X enthalten für die Tierart X spezifische hochmolekulare Stoffe, die in anderen Tierarten nicht vorkommen. Diese Stoffe sind daher für andere Tierarten (z. B. für Tierart Y) Antigene. Nehmen wir der Einfachheit halber an, die Erythrozyten der Tierart X besitzen nur eine Antigen-Art, die wir Antigen X nennen wollen, so ruft die Injektion von X-Erythrozyten beim Tier der Art Y die Bildung eines gegen X gerichteten Antikörpers hervor; man nennt ihn X-Antikörper oder kurz Anti-X. Ein solches zusammengehörendes Antigen-Antikörper-Paar heißt korrespondierend. Das Anti-X enthaltende Blutserum nennt man Anti-X-Serum, allgemein Immunserum. So ruft die Injektion von menschlichen Erythrozyten beim Kaninchen oder Meerschweinchen die Bildung von "Mensch-Antikörpern" hervor. Solche Antikörper heißen mit einem Sammelnamen auch Heteroantikörper - im Gegensatz zu den bald zu erwähnenden Isoantikörpern. Die Bildung von Heteroantikörpern ist umso geringer ausgeprägt, je näher die Verwandtschaft zweier untersuchter Tierarten ist. Auf dieser Tatsache beruht ein Verfahren der modernen experimentellen Systematik zur Einordnung der einzelnen Arten in ein phylogenetisches System.

Zur Reaktion der Antikörper mit den korrespondierenden Antigenen müssen an beiden Reaktanten bestimmte Reaktionsorte (determinante Gruppen oder Rezeptoren) vorhanden sein. Der Rezeptor eines Antigens bestimmt seine Spezifität. Daher sind

Veränderungen des Antigen-Moleküls, die nicht den Rezeptor treffen, sondern andere, "inerte" Teile des Antigen-Moleküls, ohne Folgen für die Reaktionsfähigkeit mit dem korrespondierenden Antikörper. Werden beträchtliche Anteile des Antigen-Moleküls abgespalten, so daß ein niedermolekularer, den Rezeptor tragender Körper übrigbleibt, so kann dieses Bruchstück ebenfalls mit dem korrespondierenden Antikörper noch reagieren; es wirkt aber nicht mehr als Antigen, kann also keine Antikörperbildung mehr hervorrufen. Ein solches Bruchstück nennt man ein Hapten (LANDSTEINER, 1946). Gelingt es, ein Hapten in reiner Form aus einem Antigen zu gewinnen, so ist man der chemischen Identifizierung des Rezeptors ein großes Stück näher gekommen. Die Aufklärung der chemischen Natur von Antigen-Rezeptoren ist in einigen Fällen gelungen.

Viele Säugetierarten kann man in Individuengruppen unterteilen, die sich durch die Art der auf der Oberfläche ihrer Erythrozyten befindlichen Antigene unterscheiden. Solche gruppenspezifischen Antigene sind die sogenannten Blutgruppensubstanzen. Sie wurden 1900 von LANDSTEINER beim Menschen entdeckt und mit A, B und O bezeichnet. Danach kann man alle Menschen in vier Gruppen unterteilen; die Individuen einer Gruppe besitzen das Blutgruppenmerkmal A, die der anderen Gruppe besitzen das Merkmal B, die der dritten Gruppe besitzen beide Merkmale (AB) und die der vierten Gruppe keines dieser Merkmale ("Blutgruppe O"). In diesem "klassischen" Blutgruppensystem gibt es eine Besonderheit: die korrespondierenden Antikörper finden sich normalerweise in menschlichen Seren, also nicht erst nach Immunisierung mit den entsprechenden Antigenen. Solche Antikörper, die gegen Antigene der gleichen Tierart gerichtet sind, heißen Isoantikörper. Allerdings finden sich im Serum eines Individuums nur solche Antikörper, die nicht mit den Erythrozyten-Antigenen des gleichen Individuums korrespondieren. Ein Mensch mit der Blutgruppe A hat also nur Anti-B im Serum, ein Mensch mit der Blutgruppe B hat nur Anti-A,

ein Mensch mit AB hat keine Isoantikörper, und ein Mensch mit der Blutgruppe O hat sowohl Anti-A wie Anti-B. Ähnliches gilt für einige bei Haussäugetieren entdeckte Blutgruppensysteme.

Da die ABO-Blutgruppenmerkmale zeitlebens bei demselben Individuum unverändert bleiben und nach einem streng gültigen Schema vererbt werden, hat die Bestimmung der ABO-Blutgruppen beim Menschen eine große Bedeutung für die Humangenetik und für forensische Zwecke erlangt.

Neben diesen "klassischen" Blutgruppenantigenen sind seither noch weitere menschliche Blutgruppenantigene entdeckt worden, deren korrespondierende Antikörper jedoch nicht in menschlichen Normalseren vorkommen, sondern nur in Immunseren. So wurden 1927 von LANDSTEINER und LEVINE die Blutgruppenmerkmale M und N entdeckt. Die entsprechenden Immunseren können durch Immunisieren von Kaninchen, d. h. parenterale Injektion von menschlichen M- oder N-Erythrozyten erhalten werden. Bei einem solchen Vorgehen bilden sich im Kaninchen nicht nur Anti-M bzw. Anti-N, sondern auch Antikörper gegen alle anderen artfremden Antigene der menschlichen Erythrozyten, darunter auch Anti-A, Anti-B und Anti-O (die Blutgruppensubstanz O bewirkt also die Bildung von Heteroantikörpern, während ein Isoanti-O unbekannt ist). Man kann nun alle diese Heteroantikörper oder nur bestimmte, für gewisse Untersuchungszwecke störende Heteroantikörper aus dem Immunserum durch "Absorption" entfernen. Will man z. B. ein Anti-M-Serum haben, so mischt man das Immunserum mit einem Überschuß von menschlichen Erythrozyten, die alle Antigene außer M besitzen, läßt einige Zeit stehen und zentrifugiert: dann haben die an der Erythrozytenoberfläche haftenden Antigene alle korrespondierenden Antikörper gebunden außer Anti-M, das jetzt allein im überstehenden Immunserum ("absorbiertes Immunserum") vorhanden ist.

Unter weiteren, z. T. selten auftretenden Blutgruppenmerkmalen spielt die 1939 von LEVINE und STETSON sowie 1940 von LANDSTEINER und WIENER entdeckte menschliche Rh-Blutgruppe die Hauptrolle. Wurden Kaninchen mit Erythrozyten des Rhesus-Affen (Macacus rhesus) immunisiert, so enthält dieses Kaninchen-Immunserum einen gegen ein Merkmal von Rhesusaffen-Erythrozyten gerichteten Antikörper (Anti-Rh), der auch die Erythrozyten von 85 % aller Menschen (soweit es sich um Weiße handelt) agglutiniert. Die Blutkörpercheneigenschaft dieser Menschengruppe wurde mit Rhesus-positiv (Rh-positiv, Rh +) bezeichnet. Die Erythrozyten der restlichen 15 % werden nicht agglutiniert, enthalten also nicht das korrespondierende Antigen an der Erythrozytenoberfläche. Diese Blutkörpercheneigenschaft nannte man Rhesus-negativ (rh-negativ, rh -). Nach einer von FISHER eingeführten Nomenklatur wird das Rh-Antigen D-Antigen genannt; demnach wird Anti-Rh Anti-D genannt. Diese Bezeichnung setzte sich allmählich durch, nachdem nach 1941 weitere Rh-Antikörper gefunden worden waren, so daß sich die Existenz weiterer Rh-Antigene ergab, die als Abarten oder Untergruppen des Rh-Antigens angesehen werden können; die wichtigsten dieser Untergruppen tragen die Bezeichnung C und E. Die den Merkmalen C, D und E allelomorphen rh-negativen Merkmale werden mit c, d und e bezeichnet. Rh-positive Erythrozyten enthalten in den meisten Fällen das D-Antigen, rh-negative Erythrozyten haben stets die Merkmale cde. Das D-Antigen ist das praktisch wichtigste Rh-Antigen. Im folgenden wurde stets mit Anti-D-Immunseren gearbeitet; wenn daher von Rh-positiven Erythrozyten gesprochen wird, so ist dabei stillschweigend die Agglutinierbarkeit durch Anti-D zu verstehen.

Die klinische Bedeutung des Rh-Blutgruppensystems besteht neben dem Auftreten von Transfusionszwischenfällen in der Verursachung der foetalen bzw. Neugeborenen-Erythroblastose (Morbus haemolyticus neonatorum). Denn rh-negative Menschen werden durch Injektion von Rh-positiven Erythrozyten immunisiert,

bilden also Anti-Rh. Foetales Blut kann durch Plazentadefekte, besonders gegen Ende der Gravidität, in den mütterlichen Kreislauf gelangen. Ist die Mutter rh-negativ und der Foet Rh-positiv (was immer dann der Fall ist, wenn vom Vater ein Rh-positives Gen vererbt wurde), so wird die Mutter durch solche Ereignisse immunisiert. Bei einer zweiten Gravidität können die mütterlichen Rh-Antikörper durch die intakte Plazenta ("diaplazentar") in den foetalen Kreislauf gelangen und durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit den Rh-positiven foetalen Erythrozyten diese so schädigen, daß eine schwere Blutkrankheit entsteht, nämlich die Erythroblastose. Im allgemeinen zeigt die Erythroblastose mit jeder folgenden Gravidität schwerere Grade, weil mit jeder Gravidität die Immunisierung der Mutter gesteigert wird.

Aus praktischen, aber auch aus theoretischen Gründen ist man seit langem an der Aufklärung der chemischen Struktur der Rezeptoren der Blutgruppensubstanzen interessiert. In etwa 30-jähriger Arbeit hat die Arbeitsgruppe von MORGAN (MORGAN 1943, ANNISON und MORGAN 1952, AMINOFF u. a. 1950) die Struktur der ABO-Rezeptoren aufgeklärt. Im Gegensatz hierzu sind über den chemischen Charakter der im Rh-System wirksamen determinanten Gruppen nur wenige und oftmals widersprechende Ergebnisse bekannt geworden. Das liegt wohl hauptsächlich daran, daß es noch nicht gelungen ist, eine chemisch weitgehend einheitliche Fraktion aus Bestandteilen des Organismus zu isolieren, die Rh-Antikörper bindet. CALVIN u. a. (1946) und HOWE (1951) sahen das Rh-Antigen als Lipoproteid an. PRICE u. a. (1948) und CARTER (1949) glaubten, das Rh-Hapten in der Sterinfraktion der Erythrozytenlipide angereichert zu haben. MURRAY u. a. (1950), SIEGERT und SPIELMANN (1950) sowie PROKOP (1951) schrieben dagegen der acetonunlöslichen (also sterinfreien) Fraktion der Erythrozytenlipide Haptenwirkung zu. Nach HOWE und RUSTIGAN (1950), MOSKOWITZ u. a. (1950) sowie HOWE (1951) wird jedoch die immunologische Wirksamkeit von Rh-Antigen durch Lipidlösungsmittel zerstört.

Als Ausgangsmaterial für diese Extraktionen zur Anreicherung des Rh-Antigens bzw. Rh-Haptens wurden in allen Fällen menschliche Rh-positive Erythrozyten verwendet, in deren Stroma nach BELKIN und WIENER (1944), CALVIN u. a. (1946) sowie WITEBSKY u. a. (1946) die Rh-Rezeptoren verankert sind. Darüber hinaus kommen Stoffe, welche ebenso wie das Rh-Antigen Rh-Antikörper binden können, frei in einigen Körperflüssigkeiten vor, wie dies auch bei den ABO-Substanzen der Fall ist (BOORMAN und DODD 1943). So wiesen WITEBSKY und MOHN (1945) sowie ROY und CHATTERJEA (1962) solche Substanzen in Amnion-, Cerebrospinal- und Magenflüssigkeit des Menschen nach. Dabei steht u. E. jedoch nicht fest, ob diese Substanzen mit den Rh-Antigenen der Erythrozyten identisch sind. Es ist daher besser, in solchen Fällen von einer "Rh-Aktivität" oder einer "Wirksamkeit im Rh-System" zu sprechen, wenn ein extrahierter Stoff entweder Rh-Antikörper in vitro zu binden und/oder ihre Bildung in vivo zu bewirken vermag. Wir haben im Folgenden diese Terminologie bei der Untersuchung der von uns gewonnenen Fraktionen ebenfalls angewendet.

Neben dem Rh-Antigen ist vor einigen Jahren auch ein sog. Rh-ähnliches Antigen ("Rh-like antigen") beschrieben worden; es läßt sich aus Erythrozyten, die in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert sind, durch Erwärmen auf 56° in Freiheit setzen. Dieses Antigen kann auch aus rh-negativen Erythrozyten und aus Rhesusaffen-Erythrozyten (MURRAY 1952; LEVINE u. a. 1961 a, 1961 b; MURRAY und CLARK 1952) gewonnen werden. Es scheint sogar in Schaferythrozyten vorzukommen; denn nach URBASCHEK (1960, 1961) absorbieren Schaferythrozyten, die in destilliertem Wasser gekocht worden sind, spezifisch D-Antikörper. Nach Untersuchungen von MAJSKY u. a. (1962, 1964) handelt es sich hier um einen dem Rh-Antigen nahe verwandten Faktor, der im tierischen Organismus die Bildung sog. "Rh-like-Antikörper" ("Rh like antibodies") bewirkt. Die Existenz solcher Rh-ähnlicher Antigene und ihrer korrespondierenden Antikörper erschwert die Erforschung der chemischen Natur des

Rh-Rezeptors. Auch aus diesem Grunde sprechen wir im Folgenden bei den von uns extrahierten Fraktionen von "Rh-Aktivität" und nicht von Rh-Antigen oder Rh-Hapten.

In der vorliegenden Arbeit werden Ergebnisse von serologischen und chemischen Untersuchungen gewisser Extraktivstoffe aus menschlichen Erythrozyten beschrieben. Die hierzu verwendeten serologischen Methoden werden einer kritischen Prüfung unterzogen. Die Extraktivstoffe wurden auf zwei verschiedene Arten gewonnen, nämlich durch Extraktion entweder mit Lipidlösungsmitteln oder mit Phenolwasser in der Wärme. Die durch Lipidlösungsmittel gewonnenen Extraktivstoffe enthalten die gesamten Lipide (Totallipide) der Erythrozyten. Die durch Phenolwasser extrahierten Stoffe bilden ein grauweißes Pulver und enthalten Polysaccharide; der Einfachheit halber werden sie im Folgenden als "Phenolwasserextrakt" (abgekürzt: PWE) bezeichnet. Von beiden Extraktivstoffen wurde bereits eine Rh-Aktivität beschrieben; das Totallipid ist nach THIELE (1961) sowie URBASCHEK u. a. (1961, 1963) nur in vivo serologisch wirksam, der PWE nach URBASCHEK (1964) in vitro.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. SEROLOGISCHE METHODEN

Serologische Untersuchungsmethoden beruhen auf der Reaktion eines Antikörpers mit dem korrespondierenden Antigen. Sie dienen entweder zum Nachweis eines bestimmten Antikörpers oder eines bestimmten Antigens. Im Folgenden handelt es sich nur um die Reaktion von Rh-Antikörpern, die Rh-positive Erythrozyten zur Agglutination bringen. Zur quantitativen Bestimmung von agglutinierenden Antikörpern stellt man eine Verdünnungsreihe des antikörperhaltigen Serums her und beobachtet, bis zu welcher Verdünnungsstufe nach Zusatz der korrespondierenden Erythrozyten (Test-Erythrozyten) noch eben eine sichtbare Agglutinationsreaktion erfolgt. Eine solche Bestimmung nennt man auch "Titrieren der Antikörper"; das Ergebnis der Bestimmung gibt man in einer "Titerhöhe" oder in einer "Titerbewertungszahl" (S. 14) an.

Auf entsprechende Weise läßt sich auch die antikörperbindende Eigenschaft eines Stoffes (z. B. eines Haptens) nachweisen: einen solchen Stoff läßt man zunächst mit dem Antikörper, das Gemisch dann mit den korrespondierenden Erythrozyten reagieren; die Hämagglutination bleibt dann mehr oder weniger vollständig aus (Hämagglutinationshemmungsreaktion). Für die quantitative Bestimmung der Hemmstärke eines antikörperbindenden Stoffes (Hemmstoffes) muß man die ungehemmte Antigen-Antikörper-Reaktion mit derjenigen nach Hemmstoffzusatz vergleichen. Hierfür gibt es grundsätzlich zwei Ausführungsmöglichkeiten: man wählt entweder eine passende Antikörper-Verdünnung und variiert die Hemmstoffmenge (man stellt also eine Verdünnungsreihe des Hemmstoffes her); oder man läßt die Hemmstoffmenge konstant, gibt also in jedes Röhrchen der Antikörperverdünnungsreihe die gleiche Menge Hemmstoff. Wir haben im Folgenden

die zweite Möglichkeit gewählt, da sie eine bequemere zahlenmäßige Erfassung der Hemmstärke erlaubt; die tabellarische Zusammenstellung der Versuchsergebnisse wird dadurch erleichtert.

1. Material

a) Erythrozyten

Als Testblutkörperchen verwendeten wir menschliche Rh-positive und rh-negative Erythrozyten verschiedener ABO-Blutgruppenzugehörigkeit sowie Erythrozyten des Rhesusaffen[1]. Kleinere Blutmengen wurden durch Venenpunktion entnommen und mit 3,8 %iger Natriumcitratlösung im Verhältnis 7 : 1 (V/V) versetzt. Zur Extraktion dienten größere Mengen von deplasmiertem Erythrozytensediment[2]. Alle Blutproben wurden bei + 4° im Kühlschrank aufbewahrt. Unmittelbar vor der Verwendung wurde die etwa benötigte Menge Erythrozyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die auf dem Erythrozytensediment als Haut liegenden Leukozyten wurden dabei entfernt und verworfen.

Es wurde darauf geachtet, daß bei vergleichbaren Versuchsreihen Test-Erythrozyten vom gleichen Individuum verwendet wurden.

b) Antikörperhaltige Seren

Menschliche Immunseren wurden fertig bezogen[3]. Es wurden stets Anti-D-Seren verwendet, und zwar meist solche, die inkomplette

---

1) Die Rhesusaffen (Macacus rhesus) wurden im Hygiene-Institut der Universität Freiburg i. Br. gehalten.

2) Das Erythrozytensediment wurde uns freundlicherweise von den Blutspendezentralen in Rotenburg (Hannover) und Springe (Deister) zur Verfügung gestellt.

3) Fa. H. Molter, Heidelberg

D-Antikörper enthielten, in einigen Fällen auch solche mit kompletten D-Antikörpern (zur Erläuterung der Ausdrücke "komplette" und "inkomplette" Antikörper s. S. 13).

Die inkompletten Antiseren stammten stets vom gleichen Individuum (Protokoll-Nr. 0100 der Fa. Molter), die kompletten Antiseren stammten ebenfalls vom gleichen Blutspender (Protokoll Nr. K 17 der Fa. Molter).

Die Seren wurden ohne Zusatz eines Konservierungsmittels bei + 4° aufbewahrt.

Tierische Immunseren stellten wir uns selbst her. Die hierzu verwendeten Versuchstiere wurden sechsmal (jeweils in zweitägigen Abständen) durch Injektion von je 0,5 ml einer 50 %igen Suspension frisch gewaschener Erythrozyten (menschlicher ORh-positiver oder Rhesusaffen-Erythrozyten) in physiologischer Kochsalzlösung immunisiert. Die Erythrozytensuspensionen wurden den Kaninchen durch Injektion in die Ohrvene, den Meerschweinchen durch intraperitoneale Injektion verabfolgt. Frühestens 21 Tage nach der ersten Injektion wurde den immunisierten Tieren Blut zur Serumgewinnung entnommen, und zwar den Kaninchen aus der Ohrvene, den Meerschweinchen durch einen unmittelbar vor der Entnahme gelegten Herzkatheter. Man ließ das Blut bei + 37° gerinnen. Um Kälteagglutinine durch Bindung an die Erythrozyten aus dem Serum zu entfernen, wurde das geronnene Blut mindestens 30 Minuten bei + 4° stehen gelassen. Anschließend wurde die Probe scharf zentrifugiert und das Serum abgetrennt. Um das Serum-Komplement zu zerstören, wurden die Seren 30 Minuten im Wasserbad auf 56° erwärmt. Die so "inaktivierten" Immunseren wurden ohne Zusatz von Konservierungsmitteln aufbewahrt.

Das Katheterisieren des Meerschweinchenherzens wurde folgendermaßen ausgeführt: Bei den mit Äther narkotisierten Tieren wurde die Vena jugularis interna im rechten vorderen Halsdreieck freigelegt, cranialwärts unterbunden und ein Polyäthylenkatheter bis in das rechte Herz eingeführt. Der Katheter

wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, verschlossen und für die Dauer des Versuches im rechten Herzen belassen. Zur Erhaltung der Durchgängigkeit mußte der Katheter zweimal täglich mit 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung durchspült werden. Bei der Blutentnahme wurden die ersten 0,5 ml verworfen, um eine Verdünnung des Serums mit Kochsalzlösung zu vermeiden.

Um störende Antikörper (z. B. Anti-Mensch) aus den tierischen Immunseren zu entfernen, mußten die Seren mit den entsprechenden Erythrozyten (menschliche Orh-negative Erythrozyten) "absorbiert" werden (vgl. S. 4). Die hierfür verwendeten Erythrozyten wurden scharf zentrifugiert und mit einem bestimmten Volumen des "inaktivierten" Immunserums gemischt. Das Gemisch ließ man unter mehrmaligem Umschütteln 30 Minuten im Wasserbad oder im Brutschrank bei 37° stehen. Dann wurde das Serum durch Zentrifugieren wiedergewonnen. Diese Absorption wurde mehrmals mit frischen Erythrozyten wiederholt, und zwar entweder jedesmal bei 37° (RASCH 1954) oder abwechselnd bei 37° und 4°. Die Immunseren gelangten teils unverdünnt zur Absorption; in anderen Fällen wurden sie in Verdünnungsbereichen von 1 : 1 bis 1 : 20 (verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung) verwendet, was nach DAHR (1945) häufig vorteilhaft sein soll.

2. Methoden in vitro

a) Bestimmung von Antikörpern

"Komplette" Antikörper agglutinieren korrespondierende Erythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung (Kochsalztest). Dagegen benötigen inkomplette Antikörper noch den Zusatz einer makromolekularen Substanz, die den Antikörper "komplettiert"; als Zusätze werden meist Rinderserumalbumin ("Rinderalbumintest") oder menschliches AB-Serum ("AB-Serumtest") verwendet.

Von dem zu untersuchenden Immunserum wurde eine Verdünnungsreihe in kleinen Reagensgläsern (85 mm lang, 10 mm Durchmesser) hergestellt, wobei jedes folgende Röhrchen die Hälfte der Immunserummenge des vorangehenden Röhrchens enthielt (geometrische Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 2). Als Verdünnungsmittel diente physiologische Kochsalzlösung (Kochsalztest) oder AB-Serum (AB-Serumtest). Nach Herstellen der Verdünnungsreihe war das Volumen in jedem Röhrchen gleich und betrug 0,1 ml. Dann wurde jedem Röhrchen 0,1 ml der Test-Erythrozyten (als 2 %ige Suspension in physiologischer Kochsalzlösung bzw. in AB-Serum) zugesetzt. Nach gründlichem Durchschütteln wurden die Röhrchen unverschlossen 1 Std. im Brutschrank bei 37° inkubiert. Dann wurde das Ergebnis abgelesen; hierzu wurde das Agglutinat durch vorsichtiges Drehen vom Boden der Röhrchen abgelöst. Beim Rinderalbumintest wurde die Verdünnungsreihe ebenfalls in physiologischer Kochsalzlösung angesetzt; nach der Inkubation mit Test-Erythrozyten wurden dann aber alle Röhrchen 1 Minute bei 2750 U/min. zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Rückstand mit je 2 Tropfen 20 %iger Rinderserum-Albumin-Lösung versetzt; dann wurde wieder 1 Std. bei 37° inkubiert und abgelesen.

Bei allen Tests ließ man einen Kontrollversuch mitlaufen, der sich vom Hauptversuch nur durch die Abwesenheit des Immunserums unterschied. Hier durfte keine Hämagglutination auftreten.

Die Ablesung der Hämagglutinationsstärke erfolgte in jedem einzelnen Röhrchen. Das Ergebnis wurde protokolliert. Hierbei wurde die Agglutinationsstärke in Anlehnung an RASCH (1954) folgendermaßen bezeichnet:

+++ Die Erythrozyten sind zu einem einzigen stabilen Agglutinat verbacken. Der Überstand ist klar.

++ Das Agglutinat reißt in mehrere große Stücke. Der Überstand ist klar.

\+ Das Agglutinat löst sich beim Drehen des Röhrchens in kleinen Stücken vom Boden. Der Überstand ist durch einzelne Erythrozyten getrübt.

± Makroskopisch sind einige Verklumpungen wahrzunehmen. Der Überstand hat etwa die gleiche Farbe und Trübung wie im Kontrollröhrchen.

. Keine Veränderung. Aussehen wie im Kontrollröhrchen.

Um die Titerhöhe zahlenmäßig zu erfassen, wurde folgende Bewertung der Agglutinationsstärke (abgeändert nach RACE und SANGER, 1958) eingeführt:

Agglutinationsstärke	Bewertung
+++	8
++	5
+	2
±	1
.	0

Durch Addition der jedem Röhrchen einer Verdünnungsreihe zugeordneten Bewertungsziffern erhielt man die Titerbewertungszahl (TBZ).

In den meisten Fällen wurden Doppelbestimmungen der TBZ durchgeführt. In den Tabellen des Ergebnisteils dieser Arbeit wurden dann beide Werte der TBZ angegeben. In manchen Fällen konnten wegen Materialmangels die TBZ nicht doppelt bestimmt werden; dann wurden die Versuche aber mehrmals von vorn durchgeführt (z. B. Tabelle 16, S. 59).

b) Prüfung von Hemmstoffen mit der Hämagglutinationshemmung.

Zur quantitativen Bestimmung der Antikörperbindungsfähigkeit von Hemmstoffen (Totallipid oder PWE aus Erythrozyten) wurde zunächst in einem Hämagglutinationstest der Antikörpergehalt des Immunserums ermittelt und mit der TBZ ausgedrückt. Parallel dazu wurde ein ebensolcher Test angesetzt, dem nur die Hemmsubstanz in wässriger Suspension bestimmter Konzentration vor der Inkubation zugesetzt worden war (Hämagglutinationshemmtest nach HALBAN und LANDSTEINER, 1902; WITEBSKI und MOHN, 1945), so daß jedes Röhrchen der Verdünnungsreihe die gleiche Menge Hemmstoff enthielt. Das Ergebnis dieses Tests wurde wieder in der TBZ festgelegt.

Die TBZ der gehemmten Hämagglutinationsreaktion (TBZ_H) wurde zu der der ungehemmten (TBZ_o) in Relation gesetzt, und als Hemmungsgrad oder Hemmwert (α_H) wurde definiert:

$$\alpha_H \doteq 1 - \frac{TBZ_H}{TBZ_o}$$

Hierbei ist also TBZ_o die Titerbewertungszahl der ungehemmten (ohne Hemmstoffzusatz) Hämagglutinationsreaktion, TBZ_H die der gehemmten (nach Hemmstoffzusatz). Da TBZ_H und TBZ_o stets $\geqq o$ sind, ist α_H stets $\leqq 1$. Besitzt der Hemmstoff tatsächlich eine Hemmwirkung, so ist $TBZ_o > TBZ_H$ und $\alpha_H > o$. Im Extremfall wird $TBZ_H = o$ und somit $\alpha_H = 1$ (maximale Hemmung). Erfolgt keine Hemmwirkung, so ist $TBZ_o = TBZ_H$ und somit $\alpha_H = o$. Wirkt der "Hemmstoff" fördernd auf die Hämagglutination, so wird $TBZ_H > TBZ_o$ und $\alpha_H < o$.

Selbstverständlich ist die Bestimmung der α_H-Werte mit Fehlern behaftet. Die Fehler setzen sich vornehmlich aus Pipettierfehlern und Ablesefehlern zusammen. Gegenüber der Größe der letzteren können die Pipettierfehler sicherlich vernachlässigt werden. Die Ablesefehler beruhen auf der Beurteilung der

Hämagglutinationsstärke, der eine gewisse Subjektivität anhaftet. Wir schätzen diesen subjektiven Fehler auf ± 2 Einheiten in der TBZ; er könnte z. B. dadurch entstehen, daß man in 2 Röhrchen je eine + Reaktion mit (+) bewertet. Sowohl bei der Bestimmung von TBZ_o wie bei der von TBZ_H entstehen solche Fehler, die wir mit $dTBZ_o$ und $dTBZ_H$ bezeichnen wollen. Um zu prüfen, wie sich diese Fehler maximal auf den α_H-Wert auswirken, wird das totale Differential von $\alpha_H = 1 - \frac{TBZ_H}{TBZ_o}$ gebildet; es ist

$$d\alpha_H = \left| \frac{\delta \alpha_H}{\delta TBZ_H} dTBZ_H \right| + \left| \frac{\delta \alpha_H}{\delta TBZ_o} dTBZ_o \right| = \left| \frac{dTBZ_H}{TBZ_o} \right| + \left| \frac{TBZ_H}{TBZ_o^2} dTBZ_o \right|$$

Da die absolute Größe der Fehler $dTBZ_o$ und $dTBZ_H$ unabhängig von der Größe von TBZ_o bzw. TBZ_H ist, ist die relative Auswirkung auf α_H je nach dessen Höhe verschieden. Dies wird an einigen Beispielen gezeigt:

1. Beispiel:

Großer Hemmwert α_H: $TBZ_o = 69$; $TBZ_H = 20$; $\alpha_H = 0{,}71$.

$d\alpha_H = \frac{2}{69} + \frac{20 \cdot 2}{69^2} = 0{,}037$; der prozentuale Maximalfehler ist:

$$\frac{100 \cdot d\alpha_H}{\alpha_H} = \frac{3{,}7}{0{,}71} = \pm 5{,}3\ \%.$$

2. Beispiel:

Kleiner Hemmwert α_H: $TBZ_o = 69$; $TBZ_H = 60$; $\alpha_H = 0{,}13$.

$d\alpha_H = \frac{2}{69} + \frac{60 \cdot 2}{69^2} = 0{,}054$; der prozentuale Maximalfehler ist:

$$\frac{100 \cdot d\alpha_H}{\alpha_H} = \frac{5{,}4}{0{,}13} = \pm 41{,}5\ \%.$$

3. Beispiel:

Keine Hemmung: $TBZ_o = 69$; $TBZ_H = 69$; $\alpha_H = 0$.

$d\alpha_H = \frac{2}{69} + \frac{69 \cdot 2}{69^2} = 0{,}058$

Aus diesen Beispielen geht hervor, daß die Genauigkeit des α_H-Wertes mit zunehmender Höhe steigt. Ferner ergibt das 3. Beispiel, daß α_H-Werte zwischen - 0,06 und + 0,06 praktisch als Null zu betrachten sind.

Bei der Beurteilung der Werte für TBZ_H und α_H in den Versuchen mit PWE ist folgendes zu beachten: Da die Hemmaktivität des PWE durch Lagerung stark abnahm, worauf auf S.48 und 49 ausführlich eingegangen wird, und vergleichbare Versuche oft mit verschieden stark hemmendem PWE durchgeführt wurden, weichen die TBZ_H- und α_H- Werte oft stark voneinander ab. Nur solche α_H-Werte sind untereinander vergleichbar, die in den Tabellen innerhalb der umrandeten Felder auftreten. Die Verwendung der TBZ- und α_H-Werte soll in erster Linie dazu dienen, die Ergebnisse der Hämagglutinationshemmtests in eine bequem tabellierbare Form zu bringen und auf die meist in serologischen Publikationen übliche platzraubende Mitteilung der in jedem einzelnen Röhrchen auftretenden Agglutinationsstärke zu verzichten.

c) Prüfung von Hemmstoffen mit dem Absorptionstest.

Seren mit kompletten oder inkompletten D-Antikörpern wurden mit unverändertem PWE oder mit PWE, das mit Ultraschall behandelt worden war (S.31), bei 37° im Brutschrank inkubiert. Dabei wurden 10 oder 20 mg des trockenen PWE auf 1 ml Serum verwendet. Die Inkubationsdauer betrug 10 Minuten bzw. 1, 2, 18, 20 und 24 Stdn. Anschließend wurde scharf zentrifugiert und im Überstand der Antikörpergehalt mit menschlichen ORh-positiven Erythrozyten im Rinderalbumin- oder Kochsalztest bestimmt. Zum Vergleich wurde auch der Antikörpergehalt in unbehandelten Seren bestimmt, die ebenso lange inkubiert worden waren. Die Auswertung erfolgte auch hier mit Hilfe von TBZ und α_H-Werten.

d) Prüfung von Hemmstoffen im Agar-Gel-Diffusionstest.

Der Agar-Gel-Diffusionstest beruht auf der Präzipitation von Antikörpern mit korrespondierendem Antigen, nachdem man diese beiden Reaktanten in einer Schicht von Agar-Gel hat gegeneinander diffundieren lassen. Die Präzipitation erfolgt als sichtbare Linie in einem Niveau, in dem die Reaktanten in einem günstigen Konzentrationsverhältnis vorliegen.

Der Test wurde nach OUCHTERLONY (1958) in folgender Weise ausgeführt: 3 g Difco-Agar wurden in 100 ml Wasser unter Erwärmen gelöst. Nach dem Erkalten wurde die erstarrte Masse in Stücke zerschnitten und 12 Stdn. mit fließendem Leitungswasser überspült. Dann wurden die Stücke durch Erwärmen wieder verflüssigt und das gleiche Volumen einer Boratpufferlösung (pH 8,2) zugefügt (Pufferlösung: 2 Vol.-tl. 0,2 m H_3BO_4 + 1 Vol.-tl. 0,2 m $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$). Der boratgepufferte Agar wurde im Dampftopf sterilisiert und bei + 4° aufbewahrt.

Zur Herstellung der Agar-Gel-Platten wurde der Agar auf etwa 75° erwärmt; von der Flüssigkeit wurden 2 ml mit einer Pipette auf einen Objektträger aufgetragen, so daß sich eine gleichmäßige Schicht von etwa 1 mm Dicke bildete. Nach dem Erkalten wurden aus den festen Agarplatten bis zur Glasschicht durchgehende Löcher von 7 mm Durchmesser mit einem sterilisierten Korkbohrer im Abstand von 5 mm ausgestanzt. Die Ausstanzungen wurden abwechselnd mit antigen- und antikörperhaltigen Lösungen beschickt. Die Agarplatten wurden dann bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer aufbewahrt; die Ausstanzungen wurden alle 4 Stdn. mit den gleichen Lösungen wieder aufgefüllt. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion ist nach mehreren Stdn. an einer weißen, zwischen den Ausstanzungen liegenden Präzipitationslinie zu erkennen.

Um sehr feine Präzipitationslinien noch erkennen zu können, wurde nach beendeter Reaktion eine Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Agar-Platten zunächst 12 - 24 Stdn. lang in physio-

logische Kochsalzlösung gelegt, die 2 bis 3-mal gewechselt wurde. Zum Trocknen wurden die Präparate mit Filterpapier bedeckt, das vorher mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet worden war. Dann wurden die Platten so lange einem kalten Luftstrom ausgesetzt, bis sich das Papier ablöste. Anschließend wurden die Platten 60 Minuten in eine Amidoschwarz-Lösung gelegt und danach so lange in 2 %iger Essigsäure, die mehrfach gewechselt wurde, entfärbt, bis nur noch die Präzipitationslinien gefärbt waren.

Herstellung der Amidoschwarz-Lösung: 1,5 g Amidoschwarz wurde in 850 ml WALPOLE-Pufferlösung (500 ml 6 %ige Essigsäure + 500 ml 1,35 %ige wässrige Natriumacetatlösung) gelöst und anschließend filtriert. Dann wurden 150 ml Glycerin zugesetzt. Die Lösung ist bis zu 2 Monaten haltbar.

e) Prüfung von Hemmstoffen mit der passiven Hämagglutination.

In manchen Fällen (besonders wenn es sich um ein Lipopolysaccharid handelt) kann eine antikörperbindende Substanz mit der passiven Hämagglutinationsreaktion ("Coating test") nach NETER (1956) und LUEDERITZ u. a. (1958) als solche erkannt werden. Hierbei werden Erythrozyten mit der zu prüfenden Substanz überzogen, so daß die Bindung des korrespondierenden Antikörpers an einer Hämagglutination erkannt werden kann, die ohne einen solchen Überzug nicht einträte.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: 10 mg PWE wurden in 4 ml einer 0,25 n NaOH suspendiert und 60 Minuten bei 56° inkubiert. Nach Neutralisation mit 1 n Essigsäure wurde 48 Stdn. gegen fließendes Leitungswasser dialysiert. Während der Dialyse wurde gelegentlich der pH-Wert gemessen und gegebenenfalls in die Nähe des Neutralpunktes gebracht. Nach beendeter Dialyse wurde pH 7,8 gemessen. Der Ansatz wurde mit der berechneten Menge NaCl isotonisch gemacht und in zwei Hälften

geteilt, von welchen eine unverändert, die andere nach Abzentrifugieren des ungelösten Anteils verwendet wurde. Je 0,13 ml eines Sedimentes gewaschener Orh-negativer Erythrozyten wurden zugegeben und 30 Minuten bei 37° inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten abzentrifugiert und dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Eine 2 %ige Suspension dieser Erythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung wurde im Rinderalbumintest mit Anti-D-Serum auf Agglutinationsfähigkeit geprüft. Ein Kontroll-Ansatz wurde mit AB-Serum ausgeführt.

3. Methoden in vivo

Mit menschlichen ORh-positiven Erythrozyten immunisierte Tiere (S. 11) erhielten die zu prüfenden Hemmstoffe intravenös injiziert, und zwar in folgenden Konzentrationen in physiologischer Kochsalzlösung: Totallipid 4,3 %ig (Emulsion im Homogenisator hergestellt), PWE 1 %ig, Carboxymethylcellulose (CMC) als Na-Salz 0,1-0,7 %ig. Die für den einzelnen Versuch vorgesehene Menge an Hemmstoff wurde je nach Verträglichkeit in kleineren Mengen und in verschiedenen Zeitabständen injiziert. So wurde das Totallipid jeweils im Abstande von 24 Stdn. injiziert, und etwa 24 Stdn. nach jeder Injektion wurden Blutproben zur Untersuchung des Antikörpers entnommen.

Die Untersuchung des Blutserums der Versuchstiere wurde meist erst nach der letzten Blutentnahme in einem gemeinsamen Ansatz mit der Hämagglutinationsreaktion vorgenommen. Nur in wenigen Fällen wurde der Antikörpertiter der Seren jedesmal unmittelbar im Anschluß an die Blutentnahme bestimmt.

Das Ergebnis der Untersuchungen wurde auch hier in Form der TBZ (S. 14) und der α_H-Werte (S.15) ausgedrückt. Die α_H-Werte sind bei diesen Versuchen allerdings mit etwas größeren Fehlern behaftet, und zwar aus folgenden Gründen: Die Immunseren der Versuchstiere wurden meist, wie oben erwähnt, in einem gemeinsamen Arbeitsgang untersucht. Daher ist das zuletzt gewonnene Serum

das jüngste, das zuerst gewonnene (d. h. das Vergleichsserum vor der Behandlung, auf das bei Errechnung des α_H-Wertes bezogen wurde) das älteste. Da die Antikörpertiter von Immunseren bei ihrer Aufbewahrung absinken, ist der ermittelte Antikörpertiter des zuerst gewonnenen Serums relativ am geringsten, so daß die errechneten α_H-Werte kleiner sind als der Wirklichkeit entspricht. Testete man jedoch unmittelbar nach jeder Blutentnahme, wie das in einigen Fällen geschehen ist, so war es nicht möglich, immer frische Test-Erythrozyten des gleichen Blutspenders zu verwenden; vielmehr mußten jetzt die Test-Erythrozyten für die Dauer des Versuches aufbewahrt werden. Auch dieses Verfahren führt zu leicht fehlerhaften Ergebnissen, da die Agglutinationsfähigkeit der Test-Erythrozyten bei der Aufbewahrung absinkt.

II. PRÄPARATION DER HEMMSTOFFE

1. Präparation der Lipide aus Erythrozyten

a) Extraktion mit Aethanol-Aether-Gemisch

Das gewaschene Sediment von ORh-positiven Erythrozyten wurde in das 4- bis 5-fache Volumen Aethanol (95 Vol.-%)-Aether-Gemisch (3 : 1, V/V) unter Rühren gegossen. Nach mehrstündigem Stehenlassen unter gelegentlichem Umrühren wurde das Gemisch filtriert, der Rückstand mehrmals gründlich mit Aethanol-Aether-Gemisch (3 : 1, V/V) gewaschen, und die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum weitgehend eingeengt. Der so erhaltene wässrige Rückstand wurde erschöpfend mit Petroläther (Sdp. $< 40^{\circ}$) extrahiert, die petrolätherische Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingeengt und schließlich im dunklen Vakuumexsiccator über Schwefelsäure und Paraffinschnitzeln vollends getrocknet. Ausbeute an bienenwachsartigem Totallipid: 175-190 mg/100 ml Erythrozytensediment. Dieses Extraktionsverfahren wurde in ähnlicher Weise von BLOOR (1929) für die Gewinnung von Totallipiden aus Blutserum beschrieben.

b) Extraktion nach CARTER (1949)

Das gewaschene Sediment von ORh-positiven Erythrozyten wurde mit 1/2 Volumenteil destillierten Wassers und unter Zufügen von 5 Volumenteilen Aethanols (95 Vol.-%) bei Zimmertemperatur hämolysiert. Nach halbstündigem Rühren ließ man das Gemisch 12 Stdn. bei + 1° stehen. Dann wurde abgesaugt und der Rückstand mit 50 %igem Aethanol und schließlich mit Aether extrahiert. Die aethanolischen Auszüge wurden verworfen, der ätherische wurde eingeengt und im dunklen Vakuumexsiccator über Schwefelsäure vollends getrocknet. Ausbeute an bienenwachsartigem Lipid: 185-190 mg/100 ml Erythrozytensediment.

2. Präparation des "Phenolwasserextraktes" (PWE) aus Erythrozyten

In Anlehnung an die Vorschrift zur Präparation von Phenolwasserextrakten aus Bakterien nach WESTPHAL u. a. (1952 a) wurde folgendermaßen vorgegangen: 300 ml Sediment gewaschener Erythrozyten (menschliche ORh-positive Erythrozyten oder Rhesusaffenerythrozyten) wurden mit 3200 ml Wasser und 3500 ml 96 %igem Phenol unter kräftigem Rühren auf 66 - 68° erwärmt und 1/2 Std. auf dieser Temperatur belassen. Dann ließ man auf Zimmertemperatur abkühlen und bewahrte das Gemisch anschließend 12 Stdn. bei + 1° auf. Anschließend wurde die wässrige Oberphase abgetrennt und die Unterphase nochmal mit 3200 ml Wasser (wie oben beschrieben) bei 66 - 68° extrahiert. Die vereinigten wässrigen Oberphasen wurden 1 Std. bei 4000 U/min. zentrifugiert, um Reste von Unterphase abzutrennen. Dann wurde in Cellophanschläuchen 3 Tage gegen fließendes Leitungswasser dialysiert, um Phenolreste zu beseitigen. Das Dialysat wurde im Vakuum bei 37° auf ein geringes Volumen (etwa 10 ml) eingeengt, mit einigen ml gesättigter alkoholischer Natriumazetat-Lösung und mit dem 6-fachen Volumen Aethanol (95 Vol.-%) versetzt, das zuvor auf + 1° gekühlt worden war. Dabei fiel ein weißer flockiger Niederschlag aus. Nach 12-stündigem Stehenlassen bei + 1° wurde der Niederschlag abzentrifugiert, in etwas Wasser suspendiert und gefriergetrocknet. Das so erhaltene weiße Pulver enthielt wasserlösliche und wasserunlösliche Bestandteile. Viele solcher Ansätze wurden nach dem Gefriertrocknen und der Untersuchung ihrer Hemmfähigkeit im Rh-System vereinigt und fest verschlossen bei - 15° aufbewahrt.

Zwei Sorten von PWE wurden aus menschlichen ORh-positiven Erythrozyten gewonnen: PWE I war gegen weiches Leitungswasser (3 dtsch. Härtegrade), PWE II gegen hartes Leitungswasser (23 dtsch. Härtegrade) dialysiert worden. Ausbeute: 160-180 mg PWE/100 ml Sediment menschlicher Erythrozyten; 140 mg PWE (dialysiert gegen weiches Leitungswasser) /100 ml Sediment von Rhesusaffenerythrozyten.

III. CHEMISCHE ANALYSEN

1. Ultraviolett-Spektren

Absorptionsspektren im UV-Bereich wurden mit einem automatisch registrierenden Spektralphotometer[1] bei 1 cm Schichtdicke angefertigt. Hierzu wurde eine 0,1-0,05 %ige wässrige Lösung von PWE I bzw. PWE II verwendet.

2. Bestimmung des Aschegehaltes und von Kationen

Jeweils ca. 10 mg PWE wurden in Porzellantiegeln trocken verascht und ausgewogen. In der Asche wurden Na, K und Ca flammenphotometrisch[2] bestimmt. Mg wurde (nach GLEMSER und DAUTZENBERG, 1952) nur in unmeßbar kleinen Mengen gefunden.

3. Phosphorbestimmung

Die Phosphorbestimmung erfolgte nach TEORELL (1931). Etwa 5 mg der Probe wurden in einem großen Reagensglas (18 x 180 mm) auf der Mikrowaage eingewogen, mit 0,4 ml Schwefelsäure (ca. 35 Vol.-%) auf kleiner Flamme bis zur Verkohlung erhitzt und unter Zugabe von je einem Tropfen konzentrierter Salpetersäure so oft abgeraucht, bis die Flüssigkeit farblos wurde. Zu der abgekühlten Probe wurden unter Schütteln 10 ml 0,4 %ige Ammoniummolybdat-Lösung und etwa 1 Minute danach 0,5 ml Aminonaphthol-Sulfonsäure-Reagens gegeben. 15 Minuten (bis zu 45 Minuten) danach wurde die Extinktion im Filterphotometer[3] mit Filter S 72 gegen eine

---

1) Spektralphotometer RQ II, Carl Zeiss, Oberkochen.

2) Die Bestimmung wurde freundlicherweise im Laboratorium der Universitäts-Hautklinik Göttingen ausgeführt.

3) Filterphotometer ELKO III, Carl Zeiss, Oberkochen.

Blindprobe abgelesen. Die Eichbestimmung wurde mit einer Standardlösung von Natriumphosphat, die höchstens 0,1 mg P enthielt, durchgeführt.

Herstellung des Aminonaphtholsulfonsäure-Reagens: 7,5 g $Na_2S_2O_5$ wurden in 50 ml Wasser gelöst, dazu 0,125 g umkristallisierte Aminonaphtholsulfonsäure gegeben, kräftig geschüttelt und mit einer Na_2SO_3-Lösung (1 g/5 ml) tropfenweise unter Schütteln versetzt, bis sich eine klare Lösung gebildet hatte.

4. Stickstoffbestimmung

3 - 10 mg der Probe wurden in einem Mikrokjeldahl-Kolben eingewogen und mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure in Gegenwart von etwas Kaliumsulfat und Kupfersulfat verascht; dabei wurde 15 Minuten länger gekocht, als zur Klärung der Lösung erforderlich war. Der erkaltete Kolbeninhalt wurde mit Wasser verdünnt und quantitativ in die Destillierapparatur nach PARNAS und WAGNER übergeführt. Dann wurde mit 5 ml konzentrierter (33 %) Natronlauge versetzt und destilliert. Das Destillat wurde in einer Vorlage aufgefangen, die mit 0,01 n Schwefelsäure und Indikator (Mischindikator nach TASHIRO) versetzt war. Schließlich wurde die Vorlage mit 0,01 n Natronlauge titriert. Stets wurde auch ein Blindwert bestimmt.

5. Zuckerbestimmung

Im PWE wurde eine Gesamtzuckerbestimmung mit der Anthronmethode nach RADIN u. a. (1955) sowie eine Bestimmung der reduzierenden Zucker ohne vorangehende Hydrolyse (auf Tab. 3 als "freier Zucker" bezeichnet) nach SOMOGYI (1937) vorgenommen.

a) Bestimmung des Gesamtzuckers

Etwa 5 mg der Probe wurden eingewogen, mit 2 ml 85 %iger Phosphorsäure versetzt und 15 Minuten in einem Bad auf 90° erwärmt. Dann wurde in Eiswasser 5 Minuten gekühlt und 5 ml Anthronsäure zugegeben. Diese visköse Lösung wurde gründlich gemischt, dann 24 Minuten auf 90° erwärmt und 5 Minuten in Eiswasser gekühlt. Innerhalb einer Std. wurde die Extinktion gegen einen Blindwert in einem Spektralphotometer[1] bei 620 mμ abgelesen. Die Eichbestimmung wurde mit authentischer Galaktose in der gleichen Weise durchgeführt.

Herstellung der Anthronlösung: Anthron wurde zu 2 % in konzentrierter Schwefelsäure gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden 0,3 ml dieser Lösung mit 3,7 ml Schwefelsäure (65 Vol.-%) gemischt.

b) Bestimmung des freien Zuckers

5 ml einer 1 %igen Suspension des PWE in Wasser wurden mit 5 ml Kupferreagens in einem großen (25 x 200 mm) Reagensglas versetzt. Nach Verschließen des Gefäßes mit einer Glaskugel ließ man durch Einstellen in ein heftig kochendes Wasserbad während 20 Minuten das Gemisch reagieren. Dann wurde rasch auf ca. 30° abgekühlt. Nach Zugabe von 50 ml 1 n H_2SO_4 blieb der Ansatz unter gelegentlichem Schütteln 5 - 10 Minuten stehen. Schließlich wurde 1 ml 1%ige Stärkelösung zugegeben und mit 0,005 n Thiosulfatlösung titriert. Das verbrauchte Volumen Thiosulfat wurde von dem beim Blindversuch verbrauchten Volumen Thiosulfat subtrahiert. Die erhaltene Differenz wurde an Hand einer mit authentischer Galaktose erhaltenen Eichkurve in Zucker umgerechnet.

---

1) Spektralphotometer RQ II, Carl Zeiss, Oberkochen.

Herstellung von Kupferreagens: 25 g Natriumcarbonat und 25 g Kaliumnatriumtartrat wurden in etwa 800 ml Wasser gelöst. Dann wurde eine Lösung von 4 g Kupfersulfat-pentahydrat (gelöst in etwa 40 ml Wasser) zugegeben, ferner 20 g Natriumhydrogencarbonat und 200 g Natriumsulfat (kristallwasserfrei) und die gesamte Lösung zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 6 ml 1 n KJO_3 zugegeben und im Messkolben auf 1 l mit Wasser aufgefüllt.

6. Aminozuckerbestimmung

Hierzu wurde die Methode von ELSON und MORGAN (1933) in etwas modifizierter Form angewendet. 6 ml einer etwa 0,01 %igen Suspension von PWE (auf der Mikrowaage genau eingewogen) in 2 n HCl wurden im Reagensglas eingeschmolzen und 14 Stdn. auf 100° erhitzt. Ein aliquoter Teil des Hydrolysates wurde mit 4 n NaOH neutralisiert (Phenolphthalein als Indikator) und anschließend mit Wasser im Meßkolben auf 10 ml aufgefüllt. Davon wurden 2 ml in ein Reagensglas mit Schliffstopfen überführt, mit 2 ml Acetylierungsreagens versetzt und 30 Minuten bei 96° acetyliert (Acetylierungsreagens: 0,75 ml frisch destilliertes Acetylaceton in 25 ml 1,25 n Na_2CO_3 gelöst). Dann kühlten wir mit kaltem Wasser auf Zimmertemperatur ab, setzten 20 ml Aethanol (95 Vol.-%) und 2 ml Dimethylaminobenzaldehyd (EHRLICH's Reagens) zu und lasen nach 45 Minuten die Extinktion im Filterphotometer mit Filter S 55 gegen einen entsprechend behandelten Blindwert ab. Zur Berechnung bestimmten wir den analytischen Faktor unter Verwendung von authentischem Glucosamin-hydrochlorid und rechneten auf Glucosamin um.

7. Neuraminsäurebestimmung

Neuraminsäure wurde nach BÖHM u. a. (1954) bestimmt. 0,5 ml einer 1 %igen Suspension des PWE in Wasser wurde im Zentri-

fugenglas mit Stopfen mit 1 ml BIAL'schem Reagens versetzt und mit Wasser auf ca. 2 ml aufgefüllt. Diese Mischung ließ man 15 Minuten im kochenden Wasserbad stehen. Dann wurde in Eiswasser gekühlt und mit 5 ml Amylalkohol ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die amylalkoholische Oberphase wurde mit einem Mikropipettiergerät (BOGUTH, 1950) abgehoben und im Spektralphotometer bei 570 mμ gegen einen Blindwert abgelesen. Die bei 1 cm Schichtdicke erhaltene Extinktion wurde mit 250 multipliziert, um μg Neuraminsäure im Ansatz zu erhalten.

Herstellung von BIAL'schem Reagens: 0,1 g Orcin wurden im Meßkolben in 40,7 ml konzentrierter Salzsäure gelöst; dann wurde 1 ml 1 %ige $FeCl_3$-Lösung zugefügt und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

8. Hämoglobinbestimmung

Um bei den Hämagglutinationsreaktionen eine geringfügige Hämolyse zu erkennen, wurde in bestimmten Fällen im Überstand der Hämoglobingehalt bestimmt (Bestimmung nach CREDITOR, 1953). Hierzu wurden die Teströhrchen im Anschluß an die Auswertung 1 Minute bei 2750 U/min. zentrifugiert. 0,1 ml des Überstandes wurde mit 0,9 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Zu 0,05 ml dieses Gemisches wurden im Meßkolben (10 ml) 0,2 ml Benzidinreagens (2 %ige Benzidinlösung in 20 %iger Essigsäure) und 0,1 ml 1,5 %iges Wasserstoffperoxyd gefügt und 1 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde mit 20 %iger Essigsäure auf 10 ml aufgefüllt, gemischt und nach 30 Minuten die Extinktion im Spektralphotometer bei 490 mμ gemessen. Das Ergebnis wurde mit Extinktion bei 1 cm Schichtdicke protokolliert.

9. Qualitative Analysen

Ninhydrinproben auf primäre Amine (CRAMER, 1953) und Proben mit Anilinphthalat auf reduzierende Zucker (CRAMER, 1953) wurden in Tüpfelproben auf Papier durchgeführt. Carbonat wurde nachgewiesen durch Ansäuern der Probe mit Salzsäure und Überleiten des Gases unter gelindem Erwärmen in eine Vorlage mit Barytlauge, in der sich eine weiße, in Salzsäure lösliche Trübung bildete. Die Anwesenheit von Proteinen wurde mit der Biuretprobe (in alkalischer Lösung mit Kupfersulfat) geprüft.

IV. VERHALTEN DER "PHENOLWASSEREXTRAKTE" GEGENÜBER CHEMISCHEN UND PHYSIKALISCHEN EINFLÜSSEN

1. Auftrennung mit Hilfe von Wasser

Der PWE ist nicht vollständig wasserlöslich, er läßt sich daher mit Wasser fraktionieren. Die Ausbeuten an wasserlöslicher und wasserunlöslicher Fraktion erwiesen sich als abhängig von der bei der Fraktionierung angewendeten Temperatur und von den Wasservolumina.

a) 4-stündige Extraktion bei Zimmertemperatur

50 mg PWE wurden mit 10 ml Wasser bei Zimmertemperatur 4 Stdn. gerührt (Magnetrührer), dann wurde der ungelöst gebliebene Anteil abzentrifugiert und noch 2-mal mit je 5 ml Wasser in gleicher Weise behandelt. Ausbeute an wasserunlöslichem Anteil aus PWE I 31,4 %; 30,2 % der Einwaage, aus PWE II 41,7 %; 41,2 %. Die wasserlöslichen Anteile wurden gefriergetrocknet; ihre Ausbeuten betrugen bei PWE I 68,8 %; 70,0 % der Einwaage, bei PWE II 58,2 %; 58,8 %.

b) Extraktion im Soxhlet-Apparat

Der PWE II wurde im Soxhlet-Apparat 5 Stdn. mit Wasser extrahiert. Nach Gefriertrocknung des in Lösung gegangenen Anteils und Trocknung des ungelösten Rückstandes fanden sich 75,8 % der Einwaage als löslich, 24,0 % als unlöslich.

2. Auftrennung durch Dialyse

Eine 0,044 %ige Suspension des PWE in Wasser wurde in Dialysierschläuchen aus Cellophan bei + 1° gegen das 14-fache Volumen sterilisierten destillierten Wassers während 5 bzw. 12 Tagen dialysiert. Die Außenflüssigkeit wurde täglich ein-

mal erneuert, gesammelt und nach Beendigung der Dialyse - ebenso wie der Schlauchinhalt - bei 37° im Vakuum auf ein geringes Volumen eingeengt und schließlich gefriergetrocknet und gewogen.

Nach 5-tägiger Dialyse fanden sich im Schlauchinnern 30 - 40 % der Einwaage, nach 12-tägiger Dialyse 26 - 27 %.

3. Auftrennung durch Elektrodialyse

Eine etwa 1,5 %ige Suspension des PWE I in Wasser wurde durch Zusatz von verdünnter Salzsäure auf pH 2,3 gebracht und dadurch gelöst. Dann wurde die Lösung mit Natronlauge etwa auf den Neutralpunkt gebracht. Diese Lösung wurde in die Mittelkammer eines Elektrodialysierapparates nach WOOD[1] (Dreikammergerät mit Ionenaustauschermembranen) überführt und einer Elektrodialyse unterworfen. Nachdem der Stromdurchgang fast auf Null abgesunken war, wurde der Inhalt der drei Kammern (Anodenkammer, neutrale Mittelkammer, Kathodenkammer) eingeengt und gefriergetrocknet. In der Mittelkammer fanden sich 10 - 12 % der Einwaage wieder.

4. Behandlung mit Ultraschall

Eine 0,5 %ige Suspension von PWE in Wasser wurde unter Eiskühlung 2 bzw. 10 Minuten lang bei 60 Watt mit Ultraschall[2] behandelt.

5. Thermostabilität

Um zu prüfen, ob die antikörperbindende Eigenschaft des PWE durch Erhitzen verlorengeht, wurde eine 0,8 %ige wässrige Suspension des PWE 10 bzw. 60 Minuten im Oelbad unter Rückfluß gekocht und anschließend gefriergetrocknet.

---

1) Shandon, London

2) Measuring and Scientific Equipment, London.

6. Saure Hydrolyse

Eine etwa 9 %ige Lösung des PWE in 2 n oder 6 n HCl wurde unter Rückfluß 1, 4 bzw. 8 Stdn. gekocht, im Vakuum über Ätznatron auf ein kleines Volumen eingeengt, dann gefriergetrocknet und schließlich im Hochvakuum über Ätznatron getrocknet. Dann wurde in einem passenden Volumen Wasser gelöst (pH etwa 5), mit 0,02 n Natronlauge weiter neutralisiert und das Hydrolysat unter kryoskopischer Kontrolle durch Zusatz von Kochsalzlösung isotonisch gemacht, d. h. auf eine Gefrierpunktsdepression von $0{,}56^{o}$ eingestellt.

7. Oxydation mit Perjodat

10 mg PWE wurden mit 1 ml einer m/15 Dinatriumhydrogenphosphatlösung versetzt. Nach Zugabe von 1 ml einer etwa 0,16 m Perjodsäure wurde mit festem Natriumcarbonat ein pH von 7,5 eingestellt (COFFIN und PICKLES, 1953; DYER, 1956). Ein Kontrollversuch wurde ebenso angesetzt, nur wurde physiologische Kochsalzlösung statt Perjodsäure verwendet. Beide Ansätze wurden im Dunkeln bei Zimmertemperatur 48 Stdn. gerührt (Magnetrührer). Zwecks Beendigung der Reaktion wurden beide Proben mit einem Überschuß von 0,5 m Glucoselösung versetzt und vom unlöslichen abzentrifugiert. Die Rückstände wurden so oft (mindestens 20-mal) mit Wasser gewaschen, bis mit Benzidin kein Oxydationsmittel mehr nachzuweisen war (die Nachweisgrenze lag bei $1{,}6 \cdot 10^{-7}$ Mol JO_4^-). Der wasserunlösliche Rückstand betrug nach Perjodatbehandlung 23,0; 23,1 % der Einwaage, im Kontrollversuch (ohne Perjodatbehandlung) 22,5; 22,6 %. Die vereinigten Waschflüssigkeiten wurden bis zur Perjodatfreiheit gegen fließendes Leitungswasser dialysiert und dann gefriergetrocknet.

V. VERSUCHE MIT MODELLSUBSTANZEN

1. Verwendete Modellsubstanzen

Folgende Modellsubstanzen wurden auf ihre Hemmfähigkeit im Rh-System geprüft:

a) Carboxymethylcellulose (CMC), Na-Salz, hochpolymer (Adulsion C 600 der Fa. Kalle, Wiesbaden),

b) Methylcellulose, niederpolymer (Adulsion MH 50 der Fa. Kalle, Wiesbaden)

c) Agar (Fa. Merck, Darmstadt), heiß gelöst und durch einen Leinenlappen filtriert,

d) Gummi arabicum,

e) Dextran (Fa. Mann, New York), Grade A,

f) Polyvinylalkohol, N 70-88 (Fa. Roth, Karlsruhe),

g) Inulin (Fa. Merck, Darmstadt),

h) Stärke, löslich (Fa. Merck, Darmstadt),

i) Cerebrosid, nach KLENK und LEUPOLD (1944) aus menschlichem Gehirn gewonnen.

2. Hydrolyse der Carboxymethylcellulose (CMC)

5 g CMC (Na-Salz) wurden in 400 ml Wasser gelöst und mit 400 ml 4 n HCl 4,5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Dann wurde auf ca. 190 ml im Vakuum eingeengt und von der Lösung ein Volumen von 30 ml entnommen und mit Natronlauge auf pH von etwa 5 gebracht. Dann wurde diese Lösung durch eine Säule von Ionenaustauscher I (Fa. Merck, Darmstadt), H-Form, und nach Einengen des Eluates durch eine Säule von Amberlite IR-4 B (Fa. Rohm u. Haas, Philadelphia), die mit verdünntem Ammoniakwasser vorbehandelt worden war,

geschickt und mit 0,5 n Ameisensäure eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum eingeengt und über $CaCl_2$ und Ätznatron vollends getrocknet. Dann wurde mit Aktivkohle aufgekocht und heiß filtriert und das Filtrat wieder zur Trockne gebracht. Die Kryoskopie der 1 %igen Lösung dieses Hydrolysates ergab gegenüber Wasser eine Gefrierpunktsdepression von $0{,}534^{\circ}$ (entspr. 0,29 Osmol/l). Zur Verwendung im Hämagglutinationshemmtest wurde sie daher mit physiologischer Kochsalzlösung zu gleichen Volumenteilen verdünnt.

3. Methylierung von Carboxymethylcellulose

Die Methylierung wurde in Anlehnung an die Vorschrift zur Methylierung von Cellulose (HEAD, 1952) durchgeführt. 6 g CMC (Na-Salz) wurden in Wasser gelöst und mit einer ausreichenden Menge verdünnter Salzsäure versetzt. Die dabei entstandene Fällung (freie CMC) wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, der Rückstand nochmals mit Wasser gewaschen, gefriergetrocknet und schließlich über $CaCl_2$ und Ätznatron im Vakuum getrocknet. 715 mg des getrockneten Präparates wurden mit ca. 200 ml ätherischer Diazomethanlösung (etwa 1,5 g / 100 ml enthaltend; das Diazomethan wurde frisch bereitet aus käuflichem p-Tolylsulfonyl-N-methylnitrosamid) versetzt. Nach 2,5 Stdn. Einwirkungszeit bei $+ 1^{\circ}$, nachdem die Stickstoffentwicklung praktisch beendet war, wurde eine kleine Probe des Bodenkörpers entnommen, mit Äther gewaschen und getrocknet. Nach 1 Woche wurde der Rest des Bodenkörpers von der Diazomethanlösung abfiltriert, mit Äther gewaschen und getrocknet.

Es ist anzunehmen, daß bei kurzdauernder Methylierung (2,5 Stdn.) nur die Carboxylgruppen der CMC verestert wurden, bei längerer Methylierung (1 Woche) ein Teil

(44 % nach HEAD bei Cellulose) der alkoholischen Gruppen veräthert wurden.

4. Bestimmung der Viskosität

Die Viskosität der Lösungen der Modellsubstanzen wurde bei Zimmertemperatur mit dem OSTWALD'schen Viskosimeter bestimmt.

C. ERGEBNISSE

I. UNTERSUCHUNG DER TOTALLIPIDE

1. Wirkung der nach BLOOR extrahierten Totallipide

Die nach BLOOR aus menschlichen ORh-positiven Erythrozyten extrahierten Totallipide (Methodik s. S. 22) wurden in vitro und in vivo auf ihre Hemmfähigkeit im Rh-System untersucht. Dabei zeigte sich, daß eine Hemmung der Hämagglutination (Methodik s. S. 15) weder im Kochsalztest, noch im AB-Serumtest, noch im Rinderalbumintest erfolgte, wenn menschliche oder Kaninchen-Immunseren, die Rh-Antikörper enthielten, verwendet wurden.

Um festzustellen, ob die Totallipide in vivo, d. h. nach parenteraler Injektion in immunisierte Versuchstiere, eine Bindung von Rh-Antikörpern bewirken, wurden zunächst Kaninchen mit menschlichen ORh-positiven Erythrozyten immunisiert (Methodik s. S. 11). Wir versuchten, die so erzeugten Kaninchen-Immunseren möglichst frei von störenden Antikörpern (vor allem Anti-Mensch) zu bekommen. Hierzu wurden die Immunseren zur Absorption störender Antikörper mehrmals mit menschlichen Orh-negativen Erythrozyten behandelt (Methodik s. S. 12). Wie Tabelle 1 zeigt, gelang dies nur in 5 von 20 Fällen (nämlich bei den Seren Nr. 1 - 4 und 16) in einem geringen Ausmaß; denn hier war die TBZ bei Agglutination von menschlichen Orh-negativen Erythrozyten geringer als die bei Agglutination von ORh-positiven Erythrozyten. Eine vollständige Absorption störender Antikörper müßte sich in einer fehlenden Agglutinierbarkeit von Orh-negativen Erythrozyten (TBZ = Null) bemerkbar machen. Auch durch Absorptionsversuche mit verdünnten Seren (Versuche an 12 Tieren, die in Tabelle 1 nicht mit aufgeführt werden) konnten keine besseren Ergebnisse erzielt werden.

Tabelle 1: Versuch der Gewinnung reiner Rh-Antikörper-Immunseren von Kaninchen durch Absorption (Methodik s. S. 12) störender Antikörper aus unverdünnten Seren mit menschlichen Orh-negativen Erythrozyten

Serum (Lfd.Nr.)	Zahl der Absorptionen	TBZ bei Titration des Serums mit ORh+ Erythrozyten	TBZ bei Titration des Serums mit Orh- Erythrozyten
1	4	21	14
2	4	37	33
3	4	21	18
4	4	32	29
5	4	9	10
6	4	3	3
7	4	61	63
8	4	64	67
9	4	53	56
10	4	8	13
11	4	31	37
12	4	33	39
13	4	35	39
14	4	53	69
15	6	24	26
16	6	43	49
16	8	34	24
17	6	47	54
17	8	22	30

Deshalb wurde in weiteren Untersuchungen auf die "Absorption" von tierischen Immunseren verzichtet. Wir beschränkten uns vielmehr darauf, das Vorhandensein von Rh-Antikörpern in den untersuchten Seren durch die unterschiedlich starke

Agglutination von menschlichen ORh-positiven und Orh-negativen Erythrozyten nachzuweisen. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse, die bei den einzelnen immunisierten Kaninchen durch Injektion von Totallipid-Emulsionen erzielt wurden. Die Lipidgaben beeinflußten den Antikörpertiter verschiedener Individuen unterschiedlich stark. So bewirkt z. B. bei Kaninchen Nr. 6 die erste Gabe von 70 mg Totallipid/Kg Körpergewicht einen α_H-Wert von nur 0,08, bei Kaninchen Nr. 12 führten dagegen schon 40 mg/kg Körpergewicht zu einem α_H-Wert von 0,38. Diese Streuungen sind wohl vorwiegend durch individuelle Faktoren bedingt. Die titersenkende Wirkung des Totallipids konnte bei fast jedem Tier nachgewiesen werden; ihre Beträge sind jedoch nicht ohne weiteres untereinander vergleichbar. Damit entfällt die Aufstellung einer Dosiswirkungskurve.

Im Falle einer spezifischen Senkung der Titer der Rh-Antikörper durch das Totallipid muß die TBZ der mit ORh-positiven Erythrozyten nachweisbaren Antikörper stärker gesenkt werden als die TBZ der mit Orh-negativen Erythrozyten nachweisbaren. Das ist deutlich nur bei 3 Tieren der Fall, nämlich bei Nr. 8, 9 und 10, vielleicht auch bei Tier Nr. 1 (Tabelle 2). Dagegen war eine Senkung der Titer der "unspezifischen" Antikörper in fast allen Fällen zu bemerken, was aus dem mangelnden oder geringen Unterschied der TBZ-Senkung bei Untersuchung mit ORh-positiven und Orh-negativen Erythrozyten hervorgeht.

Aus Tabelle 2 ergibt sich im einzelnen:

a) Wirkung auf die mit ORh-positiven Erythrozyten nachweisbaren Antikörper: Der Titer war nach Lipidinjektion in den meisten Fällen abgesunken, niemals angestiegen. Eine einmalige Lipidgabe von weniger als 100 mg/kg Körpergewicht hatte bei 6 Tieren (Nr. 6 - 10 und 12) eine Senkung dieses Antikörpertiters zur Folge (α_H-Werte zwischen 0,08 und 0,38). Bei 5 Tieren (Nr. 1 - 4 und 11)

Tabelle 2: Versuche zur Änderung der Titer der Antikörper gegen menschliche ORh-positive Erythrozyten bei immunisierten Kaninchen durch fraktionierte Injektion von Totallipid aus ORh-positiven Erythrozyten. Titration der Seren im AB-Serumtest (Methodik s. S. I2).

Tier (Lfd. Nr.)	Serum (Lfd. Nr.)	Menge des bei jeder Injektion verabfolgten Totallipids (mg/kg K.-Gew.)	TBZ		α_H	
			Test-Erythrozyten ORh +	Orh -	Test-Erythrozyten ORh +	Orh -
1	1	0	37	33	-	-
	2	40	35	49	0,05	-0,48
2	1	0	61	63	-	-
	2	40	64	67	-0,05	-0,06
3	1	0	53	69	-	-
	2	80	53	56	0	-0,19
4	1	0	31	37	-	-
	2	100	33	39	-0,06	-0,05
5	1	0	91	58	-	-
	2	1050	55	35	0,40	0,40
6	1	0	36	36	-	-
	2	70	33	35	0,08	0,03
	3	80	32	28	0,11	0,22
	4	70	25	25	0,31	0,31
7	1	0	20	20	-	-
	2	70	17	14	0,15	0,30
	3	80	18	15	0,10	0,25
	4	70	13	13	0,35	0,35
8	1	0	77	50	-	-
	2	100	57	48	0,26	0,04
	3	100	63	57	0,18	-0,14
	4	100	56	41	0,27	0,18
9	1	0	38	27	-	-
	2	60	30	30	0,21	-0,11
	3	60	29	30	0,24	-0,11
	4	120	31	30	0,18	-0,11
10	1	0	48	40	-	-
	2	60	37	34	0,23	0,15
	3	120	30	29	0,38	0,28
11	1	0	64	79	-	-
	2	90	65	64	-0,02	0,19
	3	100	41	71	0,36	0,10
	4	80	44	77	0,31	0,03
	5	90	39	51	0,39	0,35
12	1	0	42	61	-	-
	2	40	26	35	0,38	0,43
	3	40	33	30	0,22	0,51
	4	70	22	43	0,48	0,32
	5	75	26	34	0,38	0,48

wurde der Antikörpertiter dagegen kaum beeinflußt (α_H-Werte zwischen - 0,06 und 0,05, also innerhalb des Fehlerbereiches). Nach mehrmaliger Applikation von Totallipid wurde in allen 7 Fällen eine Senkung des Antikörpertiters beobachtet. Bei den Tieren Nr. 6, 7, 10 und 11 konnte der Titer dieser Antikörper auf diesem Wege stärker gesenkt werden als durch einmalige Injektion.

b) Wirkung auf die mit Orh-negativen Erythrozyten nachweisbaren Antikörper: Durch einmalige Gabe von weniger als 100 mg Totallipid/kg Körpergewicht wurde die TBZ in 5 von 11 Fällen gesenkt (Tier Nr. 3, 7, 10 - 12), bei 4 Tieren dagegen nicht beeinflußt (Tier Nr. 2, 4, 6, 8), bei Tier Nr. 1 und 9 stieg er sogar an. Nach mehrmaliger Verabfolgung von Totallipid wurde in 6 von 7 Fällen eine Senkung der TBZ beobachtet (Tier Nr. 6 - 8, 10 - 12). Bei den Kaninchen Nr. 6, 8, 10 und 11 konnte die TBZ dieser Antikörper durch mehrmalige Injektion stärker gesenkt werden als durch einmalige Lipidgabe. Bei Tier Nr. 9 war auch nach mehrmaliger Lipidinjektion ein TBZ-Anstieg (negativer α_H-Wert zu verzeichnen).

2. Wirkung der nach CARTER extrahierten Totallipide

Die nach CARTER extrahierten Erythrozytenlipide (Methodik s. S. 22) wurden in der von CARTER (1951) beschriebenen Weise in vitro (d. h. im Hämagglutinationshemmtest) untersucht. Eine Reproduktion der von CARTER beschriebenen Ergebnisse konnte dabei nicht erzielt werden. Es zeigte sich, daß eine vollständige Hämolyse der Testerythrozyten (schon ohne Gegenwart von Immunseren) erfolgte. Nach dem CARTER'schen Verfahren wird das Lipid in äthynolischer Lösung dem Ansatz zugegeben; wie wir durch Blindversuche feststellten, rief bereits Aethanol allein in der bei CARTER (1951) vorgesehenen Menge (Endkonzentration 11,9 Vol.-%) eine leichte Hämolyse hervor.

II. UNTERSUCHUNG DER "PHENOLWASSEREXTRAKTE" (PWE) UND IHRER WIRKUNG

1. Chemische und physikalische Eigenschaften

Eine analytisch-chemische Untersuchung wurde an den aus menschlichen ORh-positiven Erythrozyten gewonnenen "Phenolwasserextrakten" PWE I und PWE II (Erläuterung dieser Bezeichnungen s. S. 23) durchgeführt. Die von uns angewendete Extraktion mit Phenolwasser führt bei Anwendung an Bakterien erfahrungsgemäß zu proteinfreien Produkten. Entsprechend war auch in unserem Falle die Biuretprobe negativ; die Ninhydrinprobe war jedoch positiv.

Die übrigen analytisch ermittelten Daten sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Natrium, Kalium und Calcium wurden in einer Lösung der Asche des PWE in Salzsäure bestimmt und auf Gesamt-PWE umgerechnet; Magnesium war nur in Spuren zugegen. Der ungewöhnlich hohe Calciumgehalt des PWE II ist wohl auf die Dialyse gegen das sehr harte Leitungswasser zurückzuführen. In beiden PWE war auch reichlich Carbonat zugegen. Die in Tabelle 3 aufgeführten Werte für "freien Zucker" sind wohl nicht auf freie Hexosen zurückzuführen, sondern auf andere reduzierende Stoffe; denn freie Hexosen müßten durch die bei der Präparation des PWE erforderliche Dialyse entfernt worden sein. Dementsprechend war die Tüpfelprobe mit Anilinphthalat negativ; dagegen war sie nach saurer Hydrolyse positiv. Der wasserlösliche Anteil von PWE I zeigte im UV-Spektrum eine Absorption mit einem flachen Maximum bei etwa 260 mμ ($\log \alpha = 0{,}97$), so daß wir die Anwesenheit geringer Mengen von Nucleinsäuren annehmen, wie dies auch bei entsprechend gewonnenen PWE aus Bakterien beschrieben wurde (WESTPHAL u. a., 1952 a). Der PWE II zeigte dagegen kaum eine Absorption im UV-Bereich.

Tabelle 3: Ergebnis der chemischen Analysen der PWE aus menschlichen ORh-positiven Erythrozyten. Die Zahlenwerte bedeuten Gew.-% und sind auf Gesamt-PWE bezogen; die Werte in Klammern sind dagegen auf organische PWE-Substanz (Gesamt-PWE minus Asche) bezogen.

	PWE I	PWE II
leicht wasserlöslicher Anteil (Methodik s. S. 30)	68,8; 70,0	58,2; 58,8
leicht und schwer wasserlösl. Anteil (Methodik s. S. 30)	-	75,8; 76,1
Asche (Methodik s. S. 24)	43,5; 39,4	76,0; 76,0
Natrium (Methodik s. S. 24)	4,36; 4,41	3,72; 3,70
Kalium (Methodik s. S. 24)	0,83; 0,84	1,90; 1,86
Calcium (Methodik s. S. 24)	15,6; 15,8	32,6; 32,4
Phosphor (Methodik s. S. 24)	1,66; 1,66	0,13; 0,14
Stickstoff (Methodik s. S. 25)	2,90; 3,06 (5,05)	1,03; 1,09 (4,42)
Gesamtzucker (als Galaktose) (Methodik s. S. 26)	10,26;10,34 (17,5)	3,22; 3,30 (13,6)
"freier Zucker" (als Galaktose)(Methodik s. S. 26)	4,65; 4,73 (7,9)	0,71; 0,72 (3,0)
Aminozucker (als Glucosamin) (Methodik s. S. 27)	1,24; 1,29 (2,2)	0,13; 0,13 (0,55)
Neuraminsäure (Methodik s. S. 27)	2,48; 2,53 (4,2)	0,18; 0,20 (0,79)

Die beiden PWE wurden mit einer Reihe von organischen Lösungsmitteln (Petroläther, Diäthyläther, Cyclohexan, Xylol, Chloroform, Cyclohexanol, Methanol, Äthanol, Dioxan, Dimethylformamid) auf ihre Löslichkeit geprüft; sie erwiesen sich darin als praktisch unlöslich. Eine geringfügige Löslichkeit fand sich nur in Pyridin und Benzol.

Die Löslichkeit in Wasser war begrenzt; ein großer Anteil war wasserunlöslich, ein etwas geringerer Anteil blieb auch nach erschöpfender Extraktion mit Wasser (im Soxhlet-Apparat) ungelöst (Tabelle 3). Die Suspension des PWE in Wasser (0,55 %ig) wies ein pH um 9 auf. Wurde diese Suspension unter pH-Kontrolle mit Salzsäure angesäuert, so löste sich alles unter CO_2-Entwicklung auf. Eine vollständige Lösung wurde meist bei pH 5,8 erzielt; auffallend war jedoch, daß bei Alterung der PWE steigende H^+-Konzentrationen erforderlich waren, um klare Lösungen zu erhalten.

2. Versuche in vivo

Mit dem PWE versuchten wir, die Rh-Antikörper bei immunisierten Versuchstieren in vivo zu binden, d. h. ebenso vorzugehen wie bei den Versuchen mit Totallipid in vivo (S. 36). Hierzu mußten zunächst "Blindversuche" durchgeführt werden, d. h. es mußte festgestellt werden, ob der PWE nach parenteraler Injektion bei nicht-immunisierten Tieren serologisch faßbare Wirkungen zur Folge hat.

Nicht immunisierten Meerschweinchen wurde intravenös durch einen Herzkatheter (Methodik s. S. 11) eine Suspension von PWE I verabreicht. Vorher und 7 Tage nachher wurde das Serum des Versuchstieres auf inkomplette und komplette Antikörper mit menschlichen ORh-positiven Erythrozyten als Test-Erythrozyten untersucht. Tatsächlich fand sich in allen 3 untersuchten Fällen (Tabelle 4) ein Anstieg der TBZ im Rinderalbumintest, während im Kochsalztest keine Hämagglutination

auftrat. Daß die Meerschweinchenseren schon vor der PWE-Gabe geringe Titer gegen menschliche ORh-positive Erythrozyten aufwiesen (Tabelle 4), ist wahrscheinlich auf spontan vorhandene Mensch-Antikörper zurückzuführen; dieses Phänomen wird bei Meerschweinchen und Kaninchen häufig beobachtet.

Tabelle 4: Antikörpertiter bei nicht-immunisierten Meerschweinchen, untersucht mit menschlichen ORh-positiven Erythrozyten (Test-Erythrozyten). Beeinflussung dieses Titers durch einmalige intravenöse Gabe von PWE I (0,5 mg/kg Körpergewicht). Serologische Untersuchung erfolgte vor und 168 Stdn. nach PWE-Gabe.

Tier (Lfd. Nr.)		Kochsalztest (TBZ)	Rinderalbumintest (TBZ)
1	vor PWE-Gabe	0	7
	nach PWE-Gabe	0	14
2	vor PWE-Gabe	0	2
	nach PWE-Gabe	0	10
3	vor PWE-Gabe	0	6
	nach PWE-Gabe	0	13

Auch bei immunisierten Tieren hatte die intravenöse Injektion von PWE II einen Anstieg des Antikörpertiters zur Folge, der mit ORh-positiven Erythrozyten untersucht wurde. Tabelle 5 zeigt dies bei einem Kaninchen, dem mehrmals PWE injiziert wurde und das mehrmals serologisch untersucht wurde; im Rinderalbumintest war bei der letzten Untersuchung ein Titeranstieg festzustellen, im Kochsalztest war schon nach der ersten PWE-Gabe ein Anstieg der TBZ nachzuweisen, die bei

fortschreitender Versuchsdauer laufend zunahm; dagegen wies die TBZ im AB-Serum-Test uncharakteristische Schwankungen auf.

Tabelle 5: Antikörpertiter bei einem Kaninchen, das mit ORh-positiven Erythrozyten immunisiert worden war. Einfluß fraktionierter intravenöser Injektionen von PWE II auf diesen Titer, ORh-positive Erythrozyten als Test-Erythrozyten.

Menge des bei jeder Injektion verabfolgten PWE II (mg/kg K.-Gew.)	Zeit zwischen serolog.Untersuchung und vorausgegang. PWE-Gabe (Stdn.)	Kochsalztest (TBZ)	Rinderalbumintest (TBZ)	AB-Serumtest (TBZ)
0	-	37	84	50
29	18	46	82	45
14	28	52	84	40
20	16	65	87	60
40	23	60	108	48

Schließlich wurde auch bei Meerschweinchen, die gegen Rhesusaffen-Erythrozyten immunisiert worden waren, ein TBZ-Anstieg gefunden, nachdem PWE aus Rhesusaffen-Erythrozyten intravenös injiziert worden war (Tabelle 6). In diesem Falle zeigte sich nur im Rinderalbumin- und AB-Serumtest ein Titeranstieg, nicht im Kochsalztest (wie in Tabelle 4). Hier war sowohl mit menschlichen ORh-positiven als auch mit Rhesusaffen-Erythrozyten (außer im AB-Serumtest) untersucht worden; mit beiden Arten von Test-Erythrozyten wurden gleichsinnige Veränderungen gefunden (nur bei Tier Nr. 3 in Tabelle 6 zeigte sich mit ORh-positiven Erythrozyten im Rinderalbumintest ein TBZ-Abfall; möglicherweise liegt hier ein methodischer Fehler zugrunde; der Versuch konnte wegen Mangel an Affen-Erythrozyten nicht wiederholt werden).

Tabelle 6: Antikörpertiter bei Meerschweinchen, die mit Rhesusaffen-Erythrozyten immunisiert worden waren. Einfluß einer einmaligen intravenösen Injektion von PWE aus Rhesusaffen-Erythrozyten auf diesen Titer. Menschliche ORh-positive und Rhesusaffen-Erythrozyten als Test-Erythrozyten.

Tier (Lfd. Nr.)	Injizierte PWE-Menge (mg/kg K.-Gew.)	Kochsalztest		Rinderalbumintest		AB-Serumtest
		Test-Erythrozyten Mensch	Affe	Test-Erythrozyten Mensch	Affe	Test-Erythrozyten Mensch 1)
1	0	9	9	43	47	16
	8,8	7	7	59	62	24
2	0	0	15	32	37	0
	10,1	1	10	46	56	18
3	0	2	3	26	30	0
	5,0	0	2	16	36	2

1) Rhesusaffen-Erythrozyten waren als Test-Erythrozyten unbrauchbar, da diese schon durch AB-Serum agglutiniert werden

3. Versuche im Hämagglutinationshemmtest

Die einzelnen Chargen von PWE, die aus ORh-positiven Erythrozyten verschiedener Versuchspersonen stammten, wurden nach der Präparation im Rinderalbumin-Test auf ihre Rh-Aktivität untersucht, bevor sie zu den Sammelpräparaten PWE I und PWE II vereinigt wurden. Dabei erwiesen sich alle Präparate als stark aktiv; α_H-Werte bis zu 1 wurden bestimmt, wenn 0,5 mg PWE jedem Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe zugesetzt worden war. Bemerkenswert ist, daß die Aktivität (beurteilt aufgrund ihrer α_H-Werte) in den Einzelchargen beider Aufarbeitungen

(PWE I und PWE II) trotz der quantitativen Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung annähernd gleich war.

PWE I und PWE II hemmten nicht nur die Hämagglutination im Rinderalbumin-Test, sondern (schwächer) im AB-Serumtest und im Kochsalztest. Sogar PWE aus menschlichen rh-negativen Erythrozyten (Beispiel in Tabelle 8) hemmte mindestens ebenso stark wie PWE aus menschlichen Rh-positiven Erythrozyten. Dieser Befund ist nicht so sehr erstaunlich wie es auf den ersten Blick scheinen könnte (Deutung s. S. 79).

a) Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Alter des PWE

Bei den Einzelchargen des PWE II wurde eine Abnahme der Hemmwirkung mit dem Alter der Präparate beobachtet - trotz Aufbewahrung in verschlossenen Gefäßen bei - 15°. Die einzelnen zu verschiedenen Zeiten bestimmten α_H-Werte differierten zwar stark; doch läßt sich aus Abbildung 1 ersehen, daß die Hemmwirkung innerhalb von 450 Tagen entsprechend dem Verlaufe einer durch den Punkteschwarm gelegten Kurve abnimmt. Die Abnahme der α_H-Werte wurde im Laufe der Zeit immer geringer. Parallel mit der Abnahme der serologischen Aktivität ging die schon erwähnte (S. 43) Abnahme der Löslichkeit des PWE in Säuren.

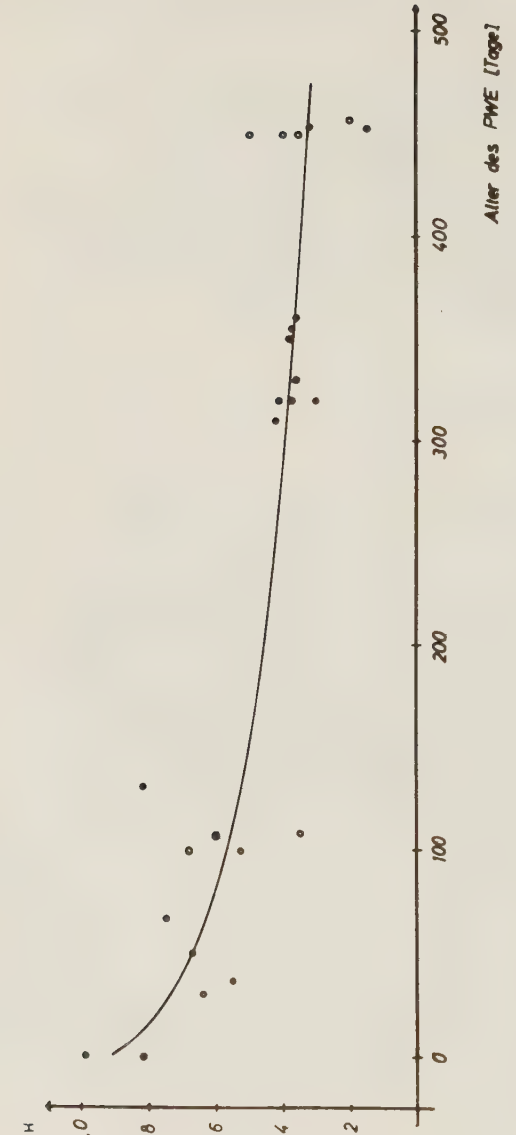

Abbildung 1: Abhängigkeit der Hemmwirkung vom Alter des PWE II (0,05 mg pro Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe) Rinderalbumintest.

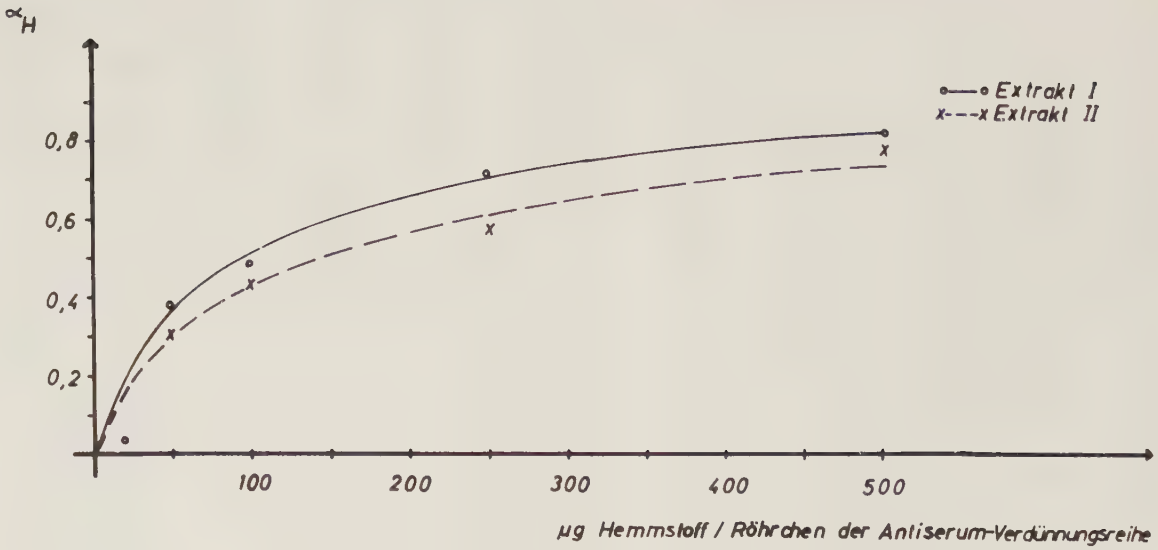

Abbildung 2: Größe der hämagglutinationshemmenden Wirkung (α_H) von PWE I und PWE II in Abhängigkeit ihrer Menge (Rinderalbumintest).

b) Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Konzentration des PWE

Die Hemmwirkung von PWE I und II im Rh-System stieg mit ihren Konzentrationen (Abbildung 2). Die in Abbildung 2 gezeigten Kurven flachen mit zunehmender PWE-Konzentration immer mehr ab. Es ist anzunehmen, daß diese Kurven in Art einer Sättigungskurve bei höheren PWE-Konzentrationen parallel zur Abszisse verlaufen. Experimentell konnte dies aber nicht mehr geprüft werden, da größere PWE-Mengen eine Hämolyse der Test-Erythrozyten hervorriefen. Im Folgenden wurde daher meist mit einer PWE-Menge von 0,5 mg pro Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe gearbeitet.

c) Hemmwirkung des PWE II im menschlichen ABO-System

Die Hemmwirkung des PWE II erwies sich im ABO-System als eindeutig geringer. Wie Tabelle 7 zeigt, hemmte der PWE II im Rh-System stärker als im A-System und in diesem wiederum stärker als im B-System.

Tabelle 7: Agglutination von menschlichen Erythrozyten verschiedener Blutgruppenzugehörigkeit durch die korrespondierenden Antikörper im Kochsalztest. Hemmwirkung von 0,5 mg PWE II pro Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe. Die Antiseren vom 1. und 2. Versuch stammten nicht von demselben Individuum, daher Abweichungen in den TBZ.

	TBZ		α_H	
	1.Vers.	2.Vers.	1.Vers.	2.Vers.
Anti-A-Serum plus A-Erythrozyten	35	32	-	-
Anti-A-Serum + PWE II plus A-Erythrozyten	19	23	0,46	0,28
Anti-B-Serum plus B-Erythrozyten	56	32	-	-
Anti-B-Serum + PWE II plus B-Erythrozyten	40	30	0,20	0,06
Anti-Rh-Serum plus ORh + Erythrozyten	39	28	-	-
Anti-Rh-Serum + PWE II plus ORh + Erythrozyten	16	8	0,59	0,71

d) Hemmwirkung von PWE aus Rhesusaffen- und Rinder-Erythrozyten

Ein PWE aus Rhesusaffen-Erythrozyten hemmte die Agglutination von ORh-positiven menschlichen Erythrozyten durch Anti-D-Serum ebenso stark wie ein gleich alter PWE aus BRh-positiven Erythrozyten (Tabelle 8). Sogar ein PWE aus Rinder-Erythrozyten wies eine Hemmwirkung der Hämagglutination im Rh-System auf (Tabelle 8).

Tabelle 8: Vergleich der hämagglutinationshemmenden Wirkung von PWE (0,5 mg/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe) aus Menschen-, Rhesusaffen- und Rinder-Erythrozyten im Rinderalbumintest.

	Anti-D-Serum plus ORh-Erythr.		Meerschweinchen-Immunserum gegen Rhesusaffen-PWE plus ORh + Erythroz.		Meerschweinchen-Immunserum gegen Rhesusaffen-PWE plus Rhesusaffen-Ery.	
	TBZ	α_H	TBZ	α_H	TBZ	α_H
Leerversuch	58	-	47	-	43	-
PWE aus:						
Rhesusaffe	9	0,84	24	0,49	31	0,28
Mensch B Rh +	9	0,84	18	0,62		
Mensch B rh -	1	0,98	13	0,72	18	0,58
Leerversuch	57	-				
PWE aus:						
Rind	38	0,33				
Mensch O Rh +	36	0,37				

Wurde Meerschweinchen-Immunserum verwendet, das durch Immunisieren mit PWE aus Rhesusaffen-Erythrozyten erzeugt worden war (vgl. S. 11),so fand sich ebenfalls eine Hemmung der Agglutination von menschlichen ORh-positiven Erythrozyten und von Rhesusaffen-Erythrozyten durch PWE aus Rhesusaffen-, menschlichen BRh-positiven oder Brh-negativen Erythrozyten (Tabelle 8). Dieser Befund erscheint uns im Hinblick auf die Antigenität des PWE bemerkenswert.

4. Versuche im Absorptionstest

Im Gegensatz zum Hämagglutinationshemmtest gelang es mit dem Absorptionstest nicht, die Bindung von kompletten oder inkompletten Rh-Antikörpern an den PWE nachzuweisen. Auch eine Variation der PWE-Menge oder der Inkubationszeit (Tabellen 9-11) oder eine vor der Inkubation ausgeführte Behandlung des PWE mit Ultraschall (Tabelle 10) führte zu keinem positiven Ergebnis.

Tabelle 9: Versuch der Absorption eines inkompletten Anti-D-Serums mit PWE II (Methodik s. S. 17)

Konzentration des PWE (mg/ml Anti-D-Serum)	Inkubationszeit (Stdn.)	TBZ	α_H
0	0,1	50; 50	-
10	0,1	48; 48	0,04
0	2,0	44; 44	-
10	2,0	47; 47	-0,07
0	18,0	52; 52	-
10	18,0	51; 51	0,02
0	1,0	52; 52	-
25	1,0	51; 51	0,02

Tabelle 10: Versuch zur Absorption eines inkompletten Anti-D-Serums mit PWE II, der 10 Minuten mit Ultraschall behandelt worden war

Konzentration des PWE (mg/ml Anti-D-Serum)	Inkubationszeit (Stdn.)	TBZ	α_H
0	1,0	60; 60	-
10	1,0	58; 58	0,03
0	20,0	66; 66	-
10	20,0	68; 68	-0,03

Tabelle 11: Versuch der Absorption (Methodik s. S.17) eines kompletten Anti-D-Serums mit PWE II.

Konzentration des PWE (mg/ml Anti-D-Serum)	Inkubationszeit (Stdn.)	TBZ	α_H
0	2,0	48; 48	-
10	2,0	48; 48	0
0	24,0	55; 55	-
10	24,0	51; 51	0,07

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß auch Versuche zur passiven Hämagglutination (Prinzip und Methodik s. S. 19) sowohl mit PWE I wie mit PWE II nicht gelangen.

5. Versuche im Agar-Gel-Diffusionstest

Im Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTERLONY (Methodik s. S.18) konnte keine serologische Aktivität des PWE im Rh-System beobachtet werden. Weder mit selbst gewonnenen tierischen Anti-Rh-haltigen Immunseren noch mit käuflichen menschlichen Anti-D- oder Anti-C-Seren traten Präzipitationslinien auf. Da nach OUCHTERLONY (1958) durch einen Antigen-Überschuß wegen der Ausbildung einer "Prozone" die Entstehung von Präzipitationslinien ausbleiben kann, wurden auch geringere (bis zu 1/8 der ursprünglichen Konzentration) PWE-Konzentrationen verwendet; aber auch in diesen Fällen erfolgte keine sichtbare Reaktion.

Wir führen diese mangelhafte Reaktionsfähigkeit auf die Schwerlöslichkeit der aktiven Komponente im PWE zurück (vgl. S. 59). Ebenso konnte durch eine Reaktion von käuflichem AB-Antigen mit Anti-A- bzw. Anti-B-Seren im Agar-Gel-Diffusionstest nicht nachgewiesen werden.

6. Versuche mit chemisch und physikalisch verändertem Phenolwasserextrakt (PWE)

a) Rh-Aktivität von PWE bei verschiedenem pH

Tabelle 12: Rh-Aktivität des PWE II in Abhängigkeit des pH seiner Ausgangssuspension. 4 Versuchsreihen. (Hämagglutinationshemmtest mit Rinderalbumin).

mg PWE II pro Röhrchen der Verdünnungsreihe	pH der wässr. Suspension	TBZ	α_H
0	-	59; 59	-
0,5	9,6	36; 36	0,39
0,5	5,8	46; 48	0,20
0	-	52; 52	-
0,5	7,4	39; 40	0,23
0	-	56; 56	-
0,5	9,6	36; 36	0,36
0,5	8,4	36; 36	0,36
0,5	7,8	41; 42	0,25
0,5	5,8	39; 39	0,30
0	-	47; 47	-
0,3	9,6	30; 30	0,36
0,3	7,4	38; 38	0,19

Die wässrige Suspension wies, wie bereits (S.43) erwähnt, ein pH um 9 auf. Bei diesem pH war die Rh-Aktivität im Hämagglutinationshemmtest (Tabelle 12) am größten, bei sinkendem pH wurde sie unter Zunahme der Löslichkeit (vgl. S.43) im allgemeinen etwas geringer. Durch nachträgliche Zugabe von OH^--Ionen zur angesäuerten PWE-Suspension ließ sich bei Erreichen des ursprünglichen pH auch die ursprüngliche Rh-Aktivität wieder herstellen. Eine Hämolyse, die zu geringe α_H-Werte hätte vortäuschen können, trat nicht auf.

Bei diesen Versuchen (Tabelle 12) bezieht sich die Angabe des pH auf die PWE-Suspension. Die End-pH-Werte in den einzelnen Röhrchen der Verdünnungsreihe ließen sich aus technischen Gründen nicht bestimmen.

b) Rh-Aktivität von PWE nach Hitzeeinwirkung

Wie Tabelle 13 zeigt, hat eine bis 60 Minuten dauernde Erhitzung des PWE (Methodik s. S. 31) keinen Aktivitätsverlust zur Folge.

Tabelle 13: Rh-Aktivität von PWE I und II nach Hitzeeinwirkung (100°). 0,5 mg PWE/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe (Hämagglutinationshemmtest).

	Dauer der Hitzeeinwirkung (Minuten)	α_H
PWE I	0	0,75
	10	0,65
	60	0,58
PWE II	0	0,55
	10	0,66
	60	0,86

c) Rh-Aktivität nach saurer Hydrolyse des PWE

Nachdem die Thermostabilität des PWE erwiesen war, konnten wir Hydrolysierungsversuche durch Einwirkung siedender Salzsäure auf PWE anstellen (Methodik s. S. 32). Wie Tabelle 14 zeigt, wurde auch durch energische Hydrolysebedingungen (6 n HCl, 8 Stdn.) keine Minderung der Rh-Aktivität beobachtet.

Tabelle 14: Rh-Aktivität des PWE I und PWE II nach saurer Hydrolyse. 0,5 mg PWE/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe (Hämagglutinationshemmtest, Rinderalbumin).

Endkonzentration an HCl	Hydrolysedauer (Stdn.)	$\varkappa_H$
0	0	0,42
2 n	1	0,44
0	0	0,36
6 n	4	0,45
6 n	8	0,38

d) Rh-Aktivität des PWE nach Lipidzusatz

Nach RAPPORT (1961) bedürfen Haptene von Lipidcharakter des Zusatzes von indifferenten (inerten) Lipiden ("auxiliary lipids"), um serologisch optimal wirksam zu sein. Da der PWE aus Erythrozyten auch eine lipide Komponente enthalten könnte (z. B. ein Lipopolysaccharid sein könnte), die in so geringen Mengen vorhanden wäre, daß sie mit chemischen Mitteln nicht sicher nachzuweisen wäre, haben wir PWE I mit Totallipid aus menschlichen Erythrozyten in verschiedenen Verhältnissen gemischt und solche Mischungen auf ihre Rh-Aktivität geprüft. Es zeigte sich jedoch in keinem Falle eine Steigerung der Hemmwirkung des PWE im Hämagglutinationshemmtest durch Lipidzusatz (Tabelle 15).

e) Rh-Aktivität der wasserlöslichen und wasserunlöslichen PWE-Anteile

Mit Wasser ließ sich eine Fraktionierung des PWE erreichen, wie aus Tabelle 3 (S. 42) zu entnehmen ist. Die Prüfung der Rh-Aktivität der verschiedenen Fraktionen im Hämagglutinationshemmtest ergab, daß sich die Rh-aktive Komponente kaum im leicht wasserlöslichen Anteil befand (Tabelle 16), sondern

Tabelle 15: Rh-Aktivität von PWE I nach Zusatz von Totallipid aus menschlichen Erythrozyten (Hämagglutinationshemmtest, Rinderalbumin).

Hemmstoffmenge (mg/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe)		TBZ	α_H
PWE	Lipid		
0	0	50	-
0,500	0	7	0,84
0	0,500	54	-0,08
0,250	0	15	0,70
0,250	0,250	14	0,72
0,100	0	25	0,50
0,100	0,400	23	0,54
0,050	0	31	0,38
0,050	0,450	41	0,18
0,017	0	47	0,06
0,017	0,483	46	0,07
0,010	0	50	0,00
0,010	0,490	58	-0,16

Tabelle 16: Rh-Aktivität von PWE und seiner Fraktionen nach 4-std. Extraktion mit Wasser (Methodik s. S.30). 0,5 mg Hemmstoff/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe. 3 Versuchsreihen (Hämagglutinationshemmtest, Rinderalbumin).

Hemmstoff	TBZ	α_H
ohne (Blindversuch)	43	-
PWE I	9	0,79
leicht wasserlösl. Anteil aus PWE I	32	0,25
Rückstand aus PWE I	7	0,84
ohne (Blindversuch)	49	-
PWE II	22	0,55
leicht wasserlösl. Anteil aus PWE II	30	0,39
Rückstand aus PWE II	12	0,75
ohne (Blindversuch)	52	-
PWE II	13	0,75
leicht wasserlösl. Anteil aus PWE II	46	0,12
Rückstand aus PWE II	15	0,71

nur durch erschöpfende Extraktion mit Wasser vollständig herauslösen ließ (Tabelle 17). Die erschöpfende Extraktion konnte entweder im Soxhlet-Apparat oder auch durch sehr häufiges Waschen bei Zimmertemperatur (wie S. 32 beschrieben) erreicht werden. Diese Ergebnisse wurden durch eine Reihe weiterer, nicht in den Tabellen 16 und 17 aufgeführten Versuche bestätigt.

Nach erschöpfender Extraktion mit Wasser zeigte der wasserunlösliche Rückstand Spontanagglutinationen (d. h. Agglutinationen auch ohne Zusatz von Immunseren) der Test-Erythrozyten. Im ursprünglichen PWE wird dieser spontanagglutinierende Effekt offenbar durch die agglutinationshemmende Wirkung des Rh-aktiven PWE-Anteils überdeckt.

Tabelle 17: Rh-Aktivität von PWE und seiner Fraktionen nach bei Zimmertemperatur erfolgter erschöpfender Extraktion mit Wasser (Hämagglutinationshemmtest, Rinderalbumin).

Hemmstoff	Hemmstoffmenge (mg/Röhrchen der Antiserum-Verdünn.-reihe)	TBZ	α_H
ohne (Blindversuch)	0	62; 62	-
PWE II	0,5	50; 49	0,21
gelöster Anteil aus PWE II	0,5	47; 49	0,22
Rückstand aus PWE II	< 0,025	62; 62	0,00
	>0,025	Spontanagglutin.	

f) Rh-Aktivität des PWE nach zusätzlicher Dialyse

Obwohl die Phenolwasserextrakte aus Erythrozyten zur Beseitigung von Phenolresten gegen Leitungswasser routinemäßig dialysiert worden waren, wurde in einigen Fällen eine zusätzliche langdauernde Dialyse gegen destilliertes Wasser angeschlossen. Wie bereits auf S. 31 beschrieben, hat eine solche zusätzliche Dialyse von 5-12 Tagen Dauer einen Gewichtsverlust auf etwa 40 % des PWE zur Folge. Sowohl der nicht-dialysierbare (hochmolekulare) Anteil (Tabelle 18) als auch der dialysierbare

(niedermolekulare) Anteil (nicht in der Tabelle aufgeführt) wurde im Hämagglutinationshemmtest auf seine Rh-Aktivität untersucht. Von mehreren Versuchsserien ist in Tabelle 18 nur eine Serie als Beispiel aufgeführt.

Tabelle 18: Rh-Aktivität des nicht-dialysierbaren (hochmolekularen) Anteils des PWE II (Hämagglutinationshemmtest, Rinderalbumin) nach zusätzlicher Dialyse gegen destilliertes Wasser.

Dauer der Dialyse (Tage)	Hemmstoffmenge (mg/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe)	TBZ	α_H
-	0	60; 60	-
0	0,04	41; 41	0,32
5	0,04	40; 41	0,32
0	0,10	35; 35	0,42
5	0,10	39; 39	0,35
-	0	47; 49	-
0	0,20	42; 42	0,13
12	0,20	23; 23	0,52

Wie Tabelle 18 zeigt, blieb die Rh-Aktivität nach 5-tägiger Dialyse von PWE II praktisch unverändert, während sie nach 12-tägiger Dialyse auf das 4-fache anstieg. Allerdings war mit der verstärkten Hemmwirkung auch eine hämolysierende Wirkung gegenüber den Test-Erythrozyten aufgetreten. Daher konnte die Rh-Aktivität nur bis zu einer Konzentration von 0,2 mg pro Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe untersucht werden, in der keine Hämolyse (gemessen am Hämoglobingehalt des Überstandes; Methodik s. S. 28) mehr erfolgte.

Der dialysierbare (niedermolekulare)Anteil des PWE II war serologisch völlig inaktiv. Wurde mehr als 0,05 mg dieses Anteils pro Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe verwendet, so kam es zu Spontanagglutinationen der Test-Erythrozyten (d. h. schon ohne Zusatz von Antiserum). In einer Konzentration von 0,025 mg/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe zeigte er keine Hemmwirkung.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß die Rh-aktive Komponente im hochmolekularen Anteil des PWE angereichert ist.

g) Rh-Aktivität des PWE nach Elektrodialyse

Der nach Elektrodialyse (Methodik s. S. 31) in der Mittelkammer verbleibende Anteil des PWE, der 10 % der eingewogenen PWE-Menge ausmachte, wies eine Rh-Aktivität auf, die fast doppelt so hoch war wie die im ursprünglichen PWE (Tabelle 19). Im Gegensatz zum vorstehend beschriebenen Versuch rief dieser nach Elektrodialyse verbleibende Rückstand keine Hämolyse der Test-Erythrozyten hervor. Die aus Anionen-und Kationenkammer isolierten Anteile bewirkten Spontanagglutinationen.

h) Rh-Aktivität des PWE II nach Behandlung mit Perjodat

Nach 48-stündiger Behandlung des PWE mit Perjodat (Methodik s. S. 32) fand sich in dem erschöpfend mit Wasser extrahierten Anteil keinerlei serologische Aktivität mehr (Tabelle 20), während in dem entsprechend behandelten Blindversuch die volle Rh-Aktivität nachzuweisen war.

Erstaunlicherweise hemmte dagegen der wasserunlösliche Anteil des mit Perjodat behandelten PWE II die Hämagglutination wesentlich stärker als unbehandelter PWE II; wie Tabelle 20 zeigt, besaßen 0,05 mg (größere Mengen bewirkten Hämolyse der Test-Erythrozyten) des nach Perjodatbehandlung wasserunlös-

Tabelle 19: Rh-Aktivität (Hämagglutinationshemmtest, Rinderalbumin) des aus der Mittelkammer gewonnenen Anteils des PWE II nach Elektrodialyse (Methodik s. S. 31)

Hemmstoff	Hemmstoffmenge (mg/Röhrchen der Antiserumverdünnungsreihe)	TBZ	$\varkappa_H$
ohne (Blindversuch)	0	52; 52	-
PWE II, gealtert	0,5	43; 44	0,15
Anteil aus Mittelkammer	0,5	38; 39	0,25
ohne (Blindversuch)	0	54; 54	-
PWE II, frisch	0,2	38; 38	0,29
Anteil aus Mittelkammer	0,2	22; 22	0,59

lichen Anteils dieselbe Hemmstärke wie 0,2 mg des unbehandelten PWE II. Der im Blindversuch erhaltene wasserunlösliche Anteil verursachte Spontanagglutinationen, wie bereits S. 60 beschrieben.

Die Versuchsserien wurden mehrmals mit praktisch gleichem Ergebnis durchgeführt. In Tabelle 20 ist eine dieser Serien als Beispiel wiedergegeben.

i) Rh-Aktivität der Asche des PWE II

Zur Kontrolle wurde auch die Asche des PWE II (Gewinnung s. S. 24) und die in gleicher Weise von ORh-positiven Erythrozyten gewonnene Asche auf Rh-Aktivität im Hämagglutinationshemmtest untersucht. Dabei zeigte sich in jedem Röhrchen der

Antiserum-Verdünnungsreihe (in dem sich die 0,5 mg PWE entsprechende Menge Asche befand) eine vollständige Hämolyse der Test-Erythrozyten.

Tabelle 20: Rh-Aktivität (Hämagglutinationshemmtest, Rinderalbumin) des PWE II nach Behandlung mit Perjodat (Methodik s. S. 32).

Hemmstoff	Hemmstoffmenge (mg/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe)	TBZ	α_H
ohne (Blindversuch)	0	46; 47	-
PWE II	0,50	13; 15	0,70
	0,20	25; 25	0,47
	0,05	47; 47	0,00
mit Wasser extrahierter Anteil nach HJO_4-Behandlung	0,50	47; 47	0,00
mit Wasser extrahierter Anteil ohne HJO_4-Behandlung	0,50	14; 14	0,70
wasserunlöslicher Anteil nach HJO_4-Behandlung	0,05	24; 26	0,47
wasserunlöslicher Anteil ohne HJO_4-Behandlung	0,05	Spontanagglutinationen	

III. UNTERSUCHUNG VON MODELLSUBSTANZEN

Bei dem Versuch, das Natrium-Salz der Carboxymethylcellulose (CMC) als Lösungsvermittler für Lipide aus ORh-positiven Erythrozyten zu verwenden, fanden wir eine hemmende Wirkung der CMC im Rh-System. Daraufhin untersuchten wir weitere Polymere und auch ein CMC-Hydrolysat auf ihre hemmende Wirkung im Rh-System.

1. Hämagglutinationshemmende Wirkung

Von den Modellsubstanzen wurde (wie bei PWE) meist je 0,5 mg pro Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe verwendet. Wie Tabelle 21 zeigt, hemmten außer CMC auch Agar und ein Cerebrosid-Präparat aus menschlichem Gehirn stark, während niedermolekulare Methylcellulose mäßige Hemmwirkung aufwies.

Außer den Werten in den Tabellen 21 - 23 wurde jeweils eine weitere Serie von Werten mit menschlichen Anti-Rh-Seren anderer Herkunft erhalten, die zu prinzipiell gleichen Ergebnissen führten.

Da CMC stark visköse Lösungen bildet, haben wir zunächst die hohe Viskosität für die Hämagglutinationshemmung verantwortlich zu machen geglaubt, da bei hoher Viskosität die Beweglichkeit aller Reaktanten (hier also vor allem des Antikörpers) beeinträchtigt ist. Setzte man aber statt CMC ein Polymeres von anderer chemischer Natur, nämlich Polyvinylpyrrolidon, in einer Konzentration ein, die die gleiche Viskosität besaß wie die verwendete CMC-Lösung, so erfolgte keine Hemmung der Hämagglutination im Rh-System (Tabelle 22). Daß die Viskosität der CMC und ihr polymerer Charakter für die Hämagglutinationshemmung keine Rolle spielt, geht auch daraus hervor, daß nach Hydrolyse der CMC (Methodik s. S. 33), wobei die Viskosität ihrer Lösung nicht mehr wesentlich von der reinen Wassers verschieden ist, dennoch eine beträchtliche Hämagglutinationshemmung erfolgte (Tabelle 22).

Tabelle 21: Hemmung der Hämagglutination durch 0,5 mg Modellsubstanz/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe (Anti-D-Serum)

Modellsubstanz	α_H (Kochsalztest)	α_H (AB-Serumtest)
CMC hochpolymer (Na-Salz)	0,71	0,54
Methylcellulose niederpolymer	0,33	0
Gummi arabicum	0,17	
Polyvinylalkohol	0,06	
Dextran	0	
Inulin	0,04	
Stärke	0	
Agar[1)]	0,84	
Cerebrosid[2)]	0,86	
CMC hochpolymer, 2,5 Stdn. methyliert[2)]	0,80	
CMC hochpolymer, 1 Woche methyliert[2, 3)]	0,08	

1) 0,25 mg/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe.

2) Suspension, da nicht hinreichend wasserlöslich.

3) Ablesung der Agglutination ungenau, da die Test-Erythrozyten fest am Boden der Röhrchen haften.

Nach kurzzeitiger Methylierung der CMC mit Diazomethan (Methodik s. S. 34), wodurch im wesentlichen nur ihre Carboxylgruppen verestert werden, blieb die Hämagglutinationshemmung in voller Höhe bestehen. Nach länger dauernder Methylierung, wodurch ein großer Teil der alkoholischen Gruppen methylveräthert wird, war praktisch keine Hämagglutinationshemmung mehr festzustellen (Tabelle 21).

Tabelle 22: Hemmung der Hämagglutination durch Modellsubstanzen bei gleicher Viskosität. Anti-D-Serum. Kochsalztest

Modellsubstanz	Modellsubstanzmenge (mg/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe)	Viskosität (cP)[1]	α_H
CMC hochpolymer (Na-Salz)	0,5	7,0	0,71
Polyvinylpyrrolidon (PVP K-90)	2,0	6,8	0
	2,08	6,9	0,12
Methylcellulose, niederpolymer	0,94	7,0	0,32
Agar	0,25	6,9	0,84
Stärke	9,8	7,1	0,35
CMC-Hydrolysat	0,5	1,4	0,53

1) 1 cP = 1 Centipoise = 10^{-2} $cm^{-1} \cdot g \cdot sec^{-1}$;
die Angabe der Viskosität gilt für die Lösung der Modellsubstanzen, von der gleiche Volumina zu jedem Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe gegeben wurden.

Schließlich wurden einige Modellsubstanzen auch im ABO-System auf Hämagglutinationshemmung geprüft. Aus Tabelle 23 ist ersichtlich, daß auch Anti-A und Anti-B gehemmt werden, wenn auch die Hemmung geringere Ausmaße hat als im Rh-System.

Tabelle 23: Hemmung der Hämagglutination durch Modellsubstanzen im ABO-System (Kochsalztest).

Modellsubstanz	Modellsubstanzmenge (mg/Röhrchen der Antiserum-Verdünnungsreihe)	$\varkappa_H$	
CMC hochpolymer	0,5	0,35	getestet
Cerebrosid aus menschlichem Gehirn	0,5	0,50	mit
Agar	0,25	0,18	Anti-A
CMC hochpolymer	0,5	0,39	getestet
Cerebrosid aus menschlichem Gehirn	0,5	0,46	mit
Agar	0,25	0,18	Anti-B

2. Wirkung im Agar-Gel-Diffusionstest

Die Untersuchung von CMC mit menschlichen Antiseren im Agar-Gel-Diffusionstest (Methodik s. S. 18) ergab in allen Fällen Präzipitationslinien. Wie Tabelle 24 zeigt, war die Reaktion von CMC mit Anti-D und Anti-C geringer ausgeprägt als mit Anti-A und Anti-B. Dieser merkwürdige Befund, der für eine Bindung von Antikörpern spricht, oder eine solche nur vortäuscht, ist uns bisher unerklärlich.

Wurde CMC im Agar-Gel-Diffusionstest in ähnlicher Weise mit tierischen Immunseren (vom Meerschweinchen oder Kaninchen) eingesetzt, so wurde in keinem Falle eine Präzipitationslinie beobachtet.

Tabelle 24: Reaktion der CMC (Na-Salz) im Agar-Gel-Diffusionstest nach OUCHTERLONY (Methodik s. S. 18)

+++ = Präzipitationslinie stark ausgeprägt
++ = " weniger stark ausgeprägt
+ = " schwach ausgeprägt
(+) = " nur schwer sichtbar
- = keine Präzipitation
/ = nicht untersucht

Versuch (Lfd. Nr.)	Antikörpergehalt des Serums	Konzentration der CMC-Lösung (%)				
		0,1	0,5	1,0	2,5	5,0
1	ohne	-	-	-	-	-
2	ohne	-	-	(+)	-	-
3	Anti-A	-	+	+	/	/
4	Anti-B	-	++	++	+++	+++
5	Anti-AB	-	+	+	++	++
6	Anti-AB	-	+	(+)	++	+++
7	Anti-AB	-	+	(+)	++	+++
8	Anti-AB	-	+	+	++	++
9	Anti-AB	/	/	++	+++	+++
10	Anti-AB	/	++	++	++	++
11	Anti-AB	-	+	+	+	+++
12	Anti-C	/	/	+	+	+
13	Anti-C	/	/	(+)	(+)	++
14	Anti-C	-	-	(+)	-	+
15	Anti-D	-	-	-	+	++
16	Anti-D	-	-	-	(+)	+
17	Anti-D	-	-	-	+	++
18	Anti-D	/	/	/	(+)	++

3. Wirkung der Carboxymethylcellulose (CMC) am immunisierten Tier in vivo

Da CMC im Hämagglutinationshemmtest und im Agar-Gel-Diffusionstest mit menschlichen Antiseren Reaktionen mit Rh-Antikörpern zu geben schien, wurde auch eine Abbindung von Rh-Antikörpern in vivo versucht. Bei durch Injektion von menschlichen ORh-positiven Erythrozyten immunisierten Kaninchen zeigte sich jedoch eine starke toxische Wirkung von intravenös injizierten CMC-Lösungen. Die Versuchstiere reagierten mit einer Erhöhung der Körpertemperatur (rektal um bis zu $1{,}5^{\circ}$). Wurde CMC zu rasch (mehr als 20 mg/min.) injiziert, so starben die Tiere innerhalb weniger Minuten.

Wurde CMC genügend langsam injiziert, so konnte bei den 3 untersuchten Tieren (Tabelle 25) ein Absinken der Titer der kompletten Antikörper beobachtet werden, während die Titer der inkompletten Antikörper nur bei 2 Tieren absanken.

Tabelle 25: Versuch der Änderung der Titer der Antikörper gegen menschliche ORh-positive Erythrozyten bei immunisierten Kaninchen durch fraktionierte intravenöse Injektion von CMC-Lösung.

/ = nicht untersucht

Tier (Lfd. Nr.)	Serum (Lfd. Nr.)	Menge des bei jeder Injektion verabfolgten CMC (mg/kg K.-Gew.)	Kochsalztest		Rinderalbumintest		AB-Serumtest	
			TBZ	$\varkappa_H$	TBZ	$\varkappa_H$	TBZ	$\varkappa_H$
1	1	0	55	-	81	-	/	/
	2	20	40	0,27	72	0,11	/	/
	3	10	38	0,31	58	0,28	/	/
2	1	0	53	-	68	-	40	-
	2	20	51	0,04	79	-0,16	48	-0,20
	3	60	45	0,15	77	-0,13	48	-0,20
	4	20	47	0,11	71	-0,04	/	/
	5	20	44	0,17	74	-0,09	45	-0,13
3	1	0	46	-	70	-	53	-
	2	70	35	0,24	64	0,08	40	0,24
	3	30	32	0,30	63	0,10	37	0,30

D. DISKUSSION

I. DISKUSSION DER SEROLOGISCHEN METHODEN

Es gibt in der Serologie grundsätzlich zwei Möglichkeiten, um die Anwesenheit einer determinanten Gruppe nachzuweisen, nämlich einerseits durch Versuche in vivo, andererseits durch Versuche in vitro. In beiden Fällen handelt es sich darum, die determinante Gruppe an den korrespondierenden Antikörper zu binden und die erfolgte Bindung nachzuweisen. In vivo erfolgt dies bei immunisierten Tieren durch Nachweis einer Titersenkung des korrespondierenden Antikörpers nach Injektion des zu prüfenden Stoffes. In vitro wird der Titer eines Immunserums vor und nach Beimischung des zu prüfenden Stoffes bestimmt.

Eine Aussage über das Antikörperbindungsvermögen eines Stoffes ist dann am sichersten, wenn der Nachweis mit beiden Verfahren gelingt. Das ist aber aus verschiedenen Gründen nicht immer möglich. So kann z. B. ein Stoff, der in vitro eine antikörperbindende Wirkung aufweist, in vivo gleichzeitig antigen wirken, so daß die Bindung des Antikörpers in vivo durch eine Neubildung von Antikörpern wettgemacht oder gar überkompensiert wird. Gewöhnlich wird die Antikörperbestimmung in vivo frühestens 12 Stdn. nach Applikation des zu prüfenden Stoffes vorgenommen; in dieser Zeit ist die Neubildung von korrespondierendem Antikörper sehr wohl möglich (HUMMEL, 1952). Ein vollständiges Übereinstimmen des Versuchsergebnisses in vivo mit dem in vitro ist nur bei Stoffen mit Haptencharakter zu erwarten.

1. Versuche in vivo

In der Rh-Serologie finden vorwiegend Meerschweinchen und Kaninchen als Versuchstiere Verwendung. Meerschweinchen gelten als bessere Rh-Antikörperbildner als Kaninchen. Bei Meer-

schweinchen läßt sich wegen der ungünstigen Venenverhältnisse Blut nur durch Herzpunktion oder Herzkatheter entnehmen. In unseren Versuchen war dabei die Letalität so hoch, daß wir für Versuche, bei welchen wiederholte Blutentnahmen erforderlich waren, Kaninchen bevorzugten.

Da für die Entstehung der Erythroblastose (vgl. S. 5) hauptsächlich inkomplette Rh-Antikörper verantwortlich gemacht werden, kam es uns bei der Prüfung unserer Hemmstoffe insbesondere auf die Beobachtung ihrer Wirkung auf Antikörper dieser Art an. Wir führten deshalb die Antikörperbestimmungen vornehmlich im Rinderalbumin- und AB-Serumtest durch.

Bei der Prüfung des Rh-Antikörperbindungsvermögens eines Stoffes ist der strenge Nachweis zu erbringen, daß die beobachtete Titersenkung wirklich die Rh-Antikörper betrifft. Ein solcher Nachweis ist deshalb schwierig, weil Versuchstiere bei der Immunisierung mit menschlichen Rh-positiven Erythrozyten neben Rh-Antikörpern noch weitere Antikörper, nämlich "Anti-Mensch" und vermutlich auch die sog. "Rh-like antibodies" bilden. Die Bildung der letzteren ist bisher allerdings nur bei Meerschweinchen beschrieben worden (LEVINE u. a., 1961 a, 1961 b; MAJSKY u. a., 1962, 1964). Es spricht jedoch nichts gegen die Annahme, daß diese auch von anderen Tierarten, die zur Bildung von Rh-Antikörpern befähigt sind, gebildet werden können.

Zur Vermeidung von hierdurch entstehenden Irrtümern läßt sich die Tatsache ausnutzen, daß die beiden letztgenannten Arten von Antikörpern auch mit Orh-negativen Antikörpern reagieren. Zur Entfernung dieser störenden Antikörper könnte man die zu prüfenden Immunseren erschöpfend mit Orh-negativen Erythrozyten behandeln. 4 - 8 Absorptionsschritte genügten hierzu jedoch nicht (s. S.36/37). Bei einer Erhöhung der Zahl der Absorptionsschritte entstehen aber durch das mit dem Sediment der Orh-negativen Erythrozyten mitgeschleppte Flüssigkeitsvolumen immer stärkere Verdünnungen des zu untersuchenden Immunserums, wodurch die Titerbestimmungen verfälscht werden. Auch

gelang LANDSTEINER (zit. nach DAHR, 1945) keine befriedigende Absorption von Kaninchen-Immunseren. Nach diesen LANDSTEINER'schen Versuchen ist offenbar nicht mehr mit Kaninchen-Immunseren im Rh-System gearbeitet worden, sondern mit Meerschweinchen-Immunseren. Aber auch dann ist, wie DAHR (1948) berichtet, die Gewinnung von brauchbaren Immunseren nur in wenigen Fällen, d. h. mit großem Aufwand an Tiermaterial, möglich. Da wir jedoch ein möglichst einfaches Verfahren zum Nachweis der Hemmfunktion von Erythrozyten-Extrakten brauchten, erschien uns ein solcher Aufwand nicht gerechtfertigt. Wir beschritten daher, wie von LANDSTEINER nach erfolglosen Absorptionen an Kaninchen-Immunseren empfohlen wurde (zit. nach DAHR, 1945), einen anderen Weg: wir führten vergleichende Titrationen der Immunseren mit ORh-positiven und Orh-negativen Erythrozyten durch. Bei der großen Streubreite der Ergebnisse verließen wir uns dabei nicht auf Einzelwerte, sondern verfolgten beim einzelnen Versuchstier die unterschiedlich starke Agglutination beider Arten von Erythrozyten in Abhängigkeit von der verabfolgten Dosis des zu prüfenden Hemmstoffes und führten solche Bestimmungsreihen bei einer möglichst großen Zahl von Versuchstieren durch (Tabelle 2, S. 39).

Die Differenz aus den Ergebnissen vergleichender Titrationen mit ORh-positiven und Orh-negativen Erythrozyten darf jedoch nicht als absolutes Maß für den Grad der Senkung von Rh-Antikörpertitern angesehen werden. Denn die Antigenität von Erythrozyten verschiedener Blutspender kann individuell verschieden stark ausgeprägt sein - möglicherweise durch verschieden starke Besetzung der Erythrozytenoberfläche mit den entsprechenden Antigenen. So können Unterschiede in der Mensch- und Rh-ähnlichen Antigenität bei den jeweils in einer Versuchsreihe verwendeten ORh-positiven und Orh-negativen Erythrozyten die Größe der abgelesenen Differenzen beeinflussen.

Meist wurden durch unsere Hemmstoffe auch Senkungen der mit Orh-negativen Erythrozyten nachweisbaren Antikörper beobachtet.

Dies dürfte im wesentlichen auf eine Senkung der "Rh-like antibodies" zurückzuführen sein, die in ihrem serologischen Verhalten den eigentlichen Rh-Antikörpern außerordentlich ähneln (MAJSKY u. a., 1962, 1964).

2. Versuche in vitro

Der Nachweis der Rh-Aktivität in vitro hat den Vorteil, daß er bei geringerem Substanzverbrauch besser reproduzierbare Ergebnisse liefert als der Nachweis in vivo. Beim Hämagglutinationshemmtest können jedoch Fehlerquellen auftreten, die auf unspezifische Einwirkung des zu prüfenden Stoffes auf Antikörper oder Test-Erythrozyten zurückzuführen sind, wodurch spezifische Hämagglutinationshemmungen vorgetäuscht werden. So könnte z. B. ein Stoff nur deshalb Hämagglutinationshemmungen bewirken, weil er entweder unspezifisch Proteine (darunter alle möglichen Antikörper) absorbiert oder weil er unspezifisch die Rezeptoren der Test-Erythrozyten blockiert oder eine Sphärozytose der Blutzellen begünstigt (JEANNET u. HAESSIG, 1964). Eine weitere Möglichkeit für die Fehlbeurteilung eines Hämagglutinationshemmtestes besteht darin, daß man eine durch den Hemmstoff bewirkte geringfügige Hämolyse irrtümlich als Hämagglutinationshemmung deutet. Eine solche Fehlinterpretation haben wir durch Bestimmung von Hämoglobin im Überstand der Teströhrchen vermieden.

Den Nachweis für eine spezifische Wirkung unserer Hemmstoffe erbrachten wir durch eine vergleichende Prüfung der Hemmwirkung im Rh-System und im ABO-System. Eine der oben genannten unspezifischen Wirkungen müßte sich in beiden Systemen bemerkbar machen, während Spezifität durch ausschließliche oder überwiegende Wirkung im Rh-System bewiesen wird. Eine unspezifische Hemmung durch den groben Verteilungsgrad der den Testansätzen zugesetzten PWE-Partikel wurde zusätzlich dadurch ausgeschlossen, daß in Testansätzen, in welchen der PWE durch Säurezusatz gelöst worden war, die gleiche Hemmwirkung nachzuweisen war.

Der Absorptionstest und der Agar-Gel-Diffusionstest erwiesen sich für unsere Versuche als unbrauchbar, weil sie sich von ihrer Methodik her schlechter quantitativ auswerten lassen. Mit diesen Methoden konnte nicht einmal qualitativ eine Bindung von Rh-Antikörpern nachgewiesen werden (S.53/54). Im Agar-Gel-Diffusionstest führen wir dies auf die Schwerlöslichkeit des PWE zurück. Die gleiche Beobachtung machten wir bei Versuchen im ABO-System. Auch GRABAR (1963) führt das Mißlingen von Antigen-Antikörper-Reaktionen in der Immunelektrophorese mit AB-Stoffen auf die Schwerlöslichkeit der AB-Stoffe zurück. Das Mißlingen des Absorptionstests (S.53) beruht ebenfalls möglicherweise auf der Schwerlöslichkeit der Rh-aktiven Komponente des PWE. Es ist wahrscheinlich, daß in der Inkubationslösung nur ein kleiner Teil der Rh-aktiven Komponente gelöst vorliegt, der aber mit dem ungelösten Teil im Gleichgewicht steht. Wenn nun, wie dies im Absorptionstest notwendig ist, der ungelöste Anteil abzentrifugiert wird, so wird dadurch besagtes Gleichgewicht gestört, und der an den korrespondierenden Antikörper gebundene Anteil kann wieder abdissoziieren.

II. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Seit der Entdeckung des Rh-Systems versuchte eine Reihe von Autoren, das wirksame Prinzip des Rh-Antigens aus Rh-positiven Erythrozyten oder anderem biologischen Material zu isolieren. Dabei wurden recht unterschiedliche Extraktionsverfahren angewendet. Dementsprechend war der chemische Charakter der Fraktionen, in welchen Rh-Aktivität gefunden wurde, verschieden. Hierauf wurde schon in der Einleitung (Seite 6) hingewiesen.

Darüber hinaus arbeitete eine Reihe von Autoren mit Modellsubstanzen, die Rh-aktiv sind. Auch hierbei wurde bei Stoffen unterschiedlichen chemischen Charakters Rh-Aktivität gefunden, so bei Nucleotiden (HACKEL u. a., 1958, 1960, 1960 b),

Gangliosiden und Neuraminsäure (DODD u. a., 1960, 1963, YOKOYAMA u. a., 1963), Colominsäure (BOYD, 1959, 1961), "unnatürlich" konfigurierten Zuckern wie L-Mannose, L-Glucose und D-Gulose (BOYD, 1959, 1960), ferner Streptomycin (BOYD, 1959, 1960; KOUT, 1959) und sogar bei einem Chinolinderivat (DOERDELMANN u. BOCK, 1960). Bei der Vielfalt dieser natürlichen und unnatürlichen Stoffgruppen läßt sich kein gemeinsames Prinzip erkennen; es fällt allerdings auf, daß alle erwähnten Stoffe (außer dem Chinolinderivat) Kohlenhydratkomponenten enthalten.

1. Versuche mit dem Totallipid aus Erythrozyten

Aus Rh-positiven Erythrozyten gewonnene Lipide sind schon vor 15 - 20 Jahren von verschiedenen Autoren als Rh-aktiv angesehen worden, wie bereits in der Einleitung (S.6) gesagt ist. Diese Ansichten wurden später von anderen Autoren bestritten. Wir konnten bei der Nacharbeitung der CARTER'schen (1949) Vorschriften schon aus rein technischen Gründen eine Rh-Aktivität von CARTER'schem Lipid in vitro nicht nachweisen; dieses negative Ergebnis wurde übrigens von COOMBS (1962) bestätigt. Auch unsere mit Aethanol-Aether-Gemisch gewonnenen Totallipide aus ORh-positiven Erythrozyten konnten in vitro keine Hämagglutinationshemmung im Rh-System hervorrufen, wie bereits von URBASCHEK (1961), THIELE (1961), THIELE u. URBASCHEK (1962) sowie URBASCHEK u. a. (1963, 1964 a) beschrieben wurde.

Das Totallipid aus ORh-positiven Erythrozyten war jedoch in vivo aktiv, d. h. es senkte bei immunisierten Versuchstieren den mit ORh-positiven Erythrozyten nachweisbaren Titer nach parenteraler Injektion des Totallipids (S.38-40). Da mit menschlichen ORh-positiven Erythrozyten immunisierte Versuchstiere stets auch "Mensch"-Antikörper und wahrscheinlich auch "Rh like antibodies" bilden, war der Nachweis zu erbringen, ob wirklich nur der Titer der Rh-Antikörper oder der Titer der übrigen

Antikörper gesenkt wird. In unseren Versuchen in vivo konnte eine eindeutige Senkung der Rh-Antikörper nicht nachgewiesen werden, da in den meisten Fällen der mit Orh-negativen Erythrozyten nachweisbare Titer ebenso stark gesunken war wie der mit ORh-positiven Erythrozyten nachweisbare. Nach LEVINE u. a. (1961 a, 1961 b) sind Meerschweinchen nicht in der Lage, Rh-Antikörper zu bilden, sondern nur "Rh like antibodies", also Antikörper, die dem Rh-ähnlichen Antigen korrespondieren.Setzen wir voraus, daß auch Kaninchen "Rh like antibodies" bilden können, dann würde unser Versuchsergebnis lediglich etwas über das Rh-ähnliche Antigen bzw. den korrespondierenden Antikörper aussagen. Dafür spricht, daß auch ein Totallipid aus Orh-negativen Erythrozyten dieselbe Wirkung in vivo zeigt (URBASCHEK u. a., 1963, 1964 a). Wie URBASCHEK (1961), THIELE (1961), THIELE u. URBASCHEK (1962) sowie URBASCHEK u. a. (1963) im klinischen Versuch zeigten, senkt das Totallipid aus ORh-positiven Erythrozyten nach i.v.-Injektion in vielen Fällen auch den Rh-Antikörper-Titer im menschlichen Serum. Da in menschlichen Immunseren keine Mensch-Antikörper und keine "Rh like antibodies" auftreten können, ist damit die Titersenkung der Rh-Antikörper durch das Totallipid erwiesen. Aus allen diesen Versuchen kann geschlossen werden, daß das Totallipid aus ORh-positiven Erythrozyten den Titer der Rh-Antikörper und der "Rh like antibodies" in vivo senkt. Daß beide Antikörperarten auf das Totallipid ansprechen, ist nicht sehr erstaunlich, da beide Antigenarten in menschlichen ORh-positiven Erythrozyten vorkommen und da beide Antigenarten offensichtlich sehr ähnliche serologische Wirkungen aufweisen.

Für die Deutung des merkwürdigen Befundes, daß das Totallipid aus ORh-positiven Erythrozyten nur in vivo, nicht aber in vitro wirksam ist, gibt es zwei Möglichkeiten. Es ist möglich, daß das Totallipid nur einen Teil eines Rh-Haptens (bzw. eines Rh-ähnlichen Haptens enthält, der für sich allein unwirksam ist, der aber in vivo durch Kombination mit einem weiteren

Faktor zum vollen Hapten komplettiert wird und dann den korrespondierenden Antikörper bindet. Andererseits ist es denkbar, daß das Totallipid nicht (nach Komplettierung) mit dem Antikörper reagiert, sondern daß es nach Aufnahme in die Zellen die Biosynthese der korrespondierenden (vielleicht auch anderer) Antikörper blockiert.

2. Versuche mit dem "Phenolwasserextrakt" (PWE) aus Erythrozyten und mit Modellsubstanzen

Der PWE aus menschlichen ORh-positiven Erythrozyten bewirkte bei Kaninchen und Meerschweinchen die Bildung von inkompletten, mit ORh-positiven Erythrozyten nachweisbaren Antikörpern (Tabelle 4, S. 44) bzw. steigerte die Titer dieser Antikörper bei bereits immunisierten Tieren (Tabellen 5 und 6, S. 45/46). Daraus ist zu schließen, daß der PWE die wesentlichen Teile des natürlichen Rh-Antigens oder Rh-ähnlichen Antigens enthält. Dementsprechend konnte die Bindung von Rh-Antikörpern in vitro im Hämagglutinationshemmtest nachgewiesen werden (S.46). Im Einklang damit stehen Versuche von URBASCHEK (1964 b), dem der Nachweis des Antikörperbindungsvermögens mit der passiven Hämagglutination gelang.

Auch PWE aus rh-negativen menschlichen Erythrozyten war ebenso wie PWE aus Rh-positiven Erythrozyten in der Lage, Rh-Antikörper in menschlichen Immunseren zu binden (S.47). Daraus geht hervor, daß auch rh-negative Erythrozyten das Rh-Antigen oder Teile desselben enthalten. Nach MURRAY (1961) ist dies tatsächlich der Fall; rh-negative Erythrozyten unterscheiden sich demnach von Rh-positiven nur dadurch, daß letztere den Rh-Rezeptor auch auf der Zelloberfläche enthalten und deshalb durch den Rh-Antikörper agglutinierbar sind, während rh-negative Erythrozyten den Rh-Rezeptor nur im Zellinnern enthalten. Daß Rh-positive Erythrozyten den Rh-Rezeptor nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch im Innern aufweisen, geht aus

Untersuchungen von COFFIN und PICKLES (1953) hervor, die nach Zerstörung des Rh-Rezeptors auf der Zelloberfläche durch Trypsinbehandlung der Erythrozyten erneut Rh-Rezeptoren freilegen konnten.

LEVINE (1961 a, 1961 b) hält allerdings das Rh-Antigen in rh-negativen Erythrozyten für ein Rh-ähnliches Antigen, das auch auf der Oberfläche dieser Zellen vorkommt. Demnach dürfte der PWE aus rh-negativen Erythrozyten nur "rh like antibodies" binden. Da wir eine serologische Aktivität gegenüber Rh-Antikörpern in menschlichen Immunseren fanden, in welchen "Rh like antibodies" nicht vorkommen können (andernfalls müßten die rh-negativen Erythrozyten des immunisierten Menschen in vivo agglutiniert werden), können wir mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß rh-negative Erythrozyten tatsächlich das Rh-Antigen enthalten.

Unser PWE bindet auch A- und B-Isoantikörper (Tabelle 7, S.51), wenn auch in geringerem Maße als Rh-Antikörper. Man weiß heute (YAMAKAWA, 1953, 1956, 1960; KLENK u. LAUENSTEIN, 1951; KLENK, 1960; HAKOMORI u. JEANLOZ, 1961), daß die ABO-Antigene Glykolipide sind, wobei der Kohlenhydratanteil die determinante Gruppe trägt und der lipide Anteil für die Verankerung des Antigens im Erythrozytenstroma verantwortlich ist. Es ist daher sehr wohl denkbar, daß im PWE die ABO-Antigene ganz oder bruchstückweise anzutreffen sind. Die Aufklärung der chemischen Natur der determinanten Gruppe der ABO-Substanzen wurde an wasserlöslichen Polysacchariden mit ABO-Aktivität vorgenommen (Übersicht s. MORGAN 1959). In der Anfangszeit der Forschung auf diesem Gebiete hat man ABO-Aktivität jedoch in Lipidextrakten aus menschlichen Erythrozyten gefunden (BRAHN u. SCHIFF, 1926; HALLAUER, 1934). ABO-Substanzen zeigen also verschiedenes Löslichkeitsverhalten, je nachdem, ob die lipide Komponente bei der Extraktion mit erfaßt wurde oder nicht. Ähnlich könnte die eingangs (S. 6) erwähnte verwirrende Fülle von Stoffgruppen, in welchen Rh-Aktivität gefunden wurde, erklärt werden. Das Rh-Antigen stellt möglicherweise ein Makromolekül dar, an dessen

Aufbau verschiedenartige Stoffe beteiligt sind. Bei Anwendung verschiedener Extraktionsverfahren könnte das Rh-Antigen als ganzes oder nur Teile davon, die noch Rh-Aktivität aufweisen, erfaßt werden, so daß die chemischen und Löslichkeitseigenschaften solcher Präparate durchaus unterschiedlich sein können.

Die Versuche mit den in der Literatur und in dieser Arbeit erwähnten Modellsubstanzen erlauben u. E. keine Analogieschlüsse auf die chemische Natur der determinanten Gruppe der Rh-Substanz. Denn die Verschiedenartigkeit der Rh-aktiven Modellsubstanzen und die "Unnatürlichkeit" einiger (z. B. CMC, Chinolinderivate) spricht allein schon gegen eine Spezifität derselben. Hinzu kommt, daß von den meisten Modellsubstanzen unverhältnismäßig große Mengen verwendet werden müssen, um eine meßbare Rh-Aktivität zu erreichen; so geht aus den Literaturangaben hervor, daß von den "unnatürlich" konfigurierten Zuckern 1,8 - 3,6 mg, von dem erwähnten Chinolinderivat 1,75 mg verwendet werden mußten, um die gleiche Rh-Aktivität zu erreichen wie 0,5 mg PWE (in dem die aktive Komponente sicher nur in sehr geringer Konzentration vorliegt). Von einer dieser Modellsubstanzen (nämlich Streptomycin) wurde inzwischen gezeigt (PIROFSKY u. a., 1964), daß ihre Hemmwirkung nicht auf einem immunologischen Mechanismus beruht. Zur Untersuchung der determinanten Gruppe der Rh-Substanz ist man daher auf Extrakte aus menschlichen Erythrozyten angewiesen. Wenn dabei offenbar Rh-Antigene und Rh-ähnliche Antigene gemeinsam erfaßt werden, so wird man dies zunächst in Kauf nehmen müssen. Beide Antigenarten sind außerdem serologisch so nahe miteinander verwandt, daß man zunächst keine chemischen Unterschiede wird finden können; bei der Untersuchung der chemischen Natur von Mucopolysacchariden aus menschlichen Erythrozyten von M- und N-Spezifität hat man bisher ebenfalls keine chemischen Unterschiede zwischen beiden Arten finden können (KLENK u. UHLENBRUCK, 1960).

Verschiedene Chargen des PWE zeigten erhebliche quantitative Unterschiede in ihrer chemischen Zusammensetzung (Tabelle 3, S. 42) ohne merkliche Parallelität zur Größe der Rh-Aktivität. Eine Ursache für diese Verschiedenartigkeit kann (außer für den Calciumgehalt; s. S.41) nicht mit Sicherheit angegeben werden; vielleicht sind kleine, nicht kontrollierbare Verschiedenheiten bei der Extraktion maßgebend hierfür, ähnlich wie sie für die Extraktion von Stoffen von M- und N-Aktivität angenommen wurden (KLENK u. UHLENBRUCK, 1960). Aus den chemischen Analysen kann man daher keine Schlüsse auf die chemische Natur der determinanten Gruppe der Rh-Substanz ziehen, zumal die aktive Substanz in nur sehr geringer Menge im PWE vorhanden sein dürfte. Wir haben daher den Einfluß physikalischer und chemischer Maßnahmen auf die Rh-Aktivität untersucht, um Hinweise auf die chemische Natur funktionell wichtiger PWE-Bestandteile zu erhalten.

Daß die Rh-aktive Komponente im schwer wasserlöslichen Anteil (s. S. 59) zu finden ist und daß sie nicht dialysierbar ist (s. S. 61), spricht für ihre makromolekulare Natur. Den größten Teil der im PWE reichlich vorhandenen anorganischen Ionen konnte man durch Elektrodialyse entfernen. In dem so entsalzten PWE war dennoch eine starke Rh-Aktivität nachzuweisen, so daß man die Beteiligung anorganischer Ionen als entscheidende Cofaktoren für die Rh-Aktivität ausschließen kann.

Die Beurteilung des Grades der Anreicherung der Rh-aktiven Komponente in solchen Fällen ist aus folgendem Grunde schwierig: Sowohl die durch Dialyse entfernten Anteile als auch der wasserunlösliche Rückstand nach erschöpfender Extraktion mit Wasser wirkten auf die Test-Erythrozyten spontan agglutinierend; diese spontan agglutinierende Eigenschaft überlagert wahrscheinlich im Gesamt-PWE die agglutinationshemmende Eigenschaft und mindert so die Wirksamkeit der Rh-aktiven Komponente.

Wenn auch die Suspension des PWE ein pH um 9 aufweist, so braucht dieses Phänomen nichts mit der Rh-Aktivität zu tun zu haben; dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf die hydrolysierende Wirkung der im PWE enthaltenen Alkalicarbonate zurückzuführen. Die Rh-aktive Komponente ist zwar in Wasser schwer, aber in Salzsäure leicht löslich (s. S. 55) ohne wesentliche Minderung der Wirksamkeit. Hierfür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Die Rh-aktive Komponente kann als schwerlösliches Calciumsalz im PWE vorliegen, das durch Säurezusatz gelöst wird; oder sie ist ein Amin, das im alkalischen Milieu schwerlöslich ist und nur unter Bildung eines Salzes (Hydrochlorids) leicht in Lösung geht. Die Abnahme der Rh-Aktivität mit der Lagerung des PWE (s. Abbildung 1, Seite 48) spricht eher für das Vorliegen eines Amins, da Amine im Laufe der Zeit zu undefinierten Produkten autoxydiert werden.

Obgleich die Rh-aktive Komponente in unserem PWE makromolekular sein dürfte, so ist offenbar die kleinste Rh-aktive Einheit eine niedermolekulare Verbindung. Dafür spricht die Tatsache, daß der PWE nach saurer Hydrolyse seine Rh-Aktivität nicht einbüßte (s. S. 56). Selbst eine unter energischen Bedingungen (6 n HCl, 8 Stdn. Rückfluß) ausgeführte Hydrolyse beeinträchtigte nicht die Rh-Aktivität. Unter der Annahme, daß am Aufbau der Rh-Substanz (ähnlich wie bei anderen Blutgruppensubstanzen) Polysaccharide beteiligt sind, würde man als Rh-wirksames (monomeres) Hydrolyseprodukt am ehesten Aminozucker vermuten, weil diese unter den genannten Hydrolysebedingungen noch stabil sind, während Neuraminsäure sicher und Hexosen wahrscheinlich zerstört werden (EGGE, 1963). Daß monomere Aminozucker serologisch aktiv sind, ist nicht ungewöhnlich; denn auch im ABO-System zeigen gewisse Aminozucker serologische Aktivität (MORGAN, 1959).

Die serologische Aktivität von ABO-, MN- und Rh-Rezeptoren läßt sich durch Einwirkung von Perjodat auf intakte Erythrozyten auf der Zelloberfläche zerstören. Mit Perjodat behandelte

Rh-positive Erythrozyten verlieren die Fähigkeit, mit korrespondierenden Antikörpern zu agglutinieren (MOSKOWITZ u. TREFFERS, 1950; MORGAN u. WATKINS, 1951; COFFIN u. PICKLES, 1953). Wir haben daher ähnliche Oxydationsversuche mit Perjodat bei unserem PWE angestellt. Wir erhielten in Analogie zu den oben zitierten Versuchsergebnissen einen völligen Rh-Aktivitätsverlust im schwerlöslichen Anteil des PWE (s. S. 62).

Völlig überraschend war jedoch die beträchtliche Rh-Aktivität im wasserunlöslichen Anteil nach Perjodateinwirkung, also in einer Fraktion, die ohne Perjodatbehandlung keine Rh-Aktivität aufwies. Eine befriedigende Erklärung können wir hierfür nicht geben. Es wäre vielleicht denkbar, daß ein Teil der Rh-Rezeptoren im ursprünglichen Molekülverband so eingebaut ist, daß die serologische Aktivität durch sterische Hinderung oder eine sonstige Art von Blockierung nicht in Erscheinung tritt. Durch oxydativen Abbau mit Perjodat könnten dann diese Gruppen so freigelegt werden, daß sie jetzt ihre serologische Wirkung entfalten können. Dann müßte allerdings die Zusatzhypothese gemacht werden, daß diese Rezeptoren durch Perjodat nicht weiter oxydierbar sind, was vielleicht dadurch ermöglicht wäre, daß durch entsprechende Substituenten keine freien vicinalen alkoholischen Gruppen in diesem Rezeptor vorhanden sind.

In diesem Zusammenhang ist folgender Befund von Interesse: BIGLEY u. a. (1958) behandelten Rh-positive Erythrozyten mit Perjodat, so daß die Erythrozyten nicht mehr durch Rh-Antikörper agglutiniert werden konnten. Sie fanden aber nach Abzentrifugieren der so inaktivierten Erythrozyten im Überstand Rh-Aktivität. Auch dieses Versuchsergebnis konnte nicht befriedigend gedeutet werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Serologisch im Rh-System wirksame Extraktivstoffe aus menschlichen (z. T. aus Rhesusaffen-) Erythrozyten wurden mit serologischen und chemischen Methoden untersucht. Die Extraktivstoffe wurden durch Aethanol-Aether Extraktion (Totallipid) bzw. durch Extraktion mit Phenolwasser bei 66 - 68° ("Phenolwasserextrakt" = PWE) gewonnen.

1. Das Totallipid aus menschlichen ORh-positiven Erythrozyten kann zwar in vitro keine Rh-Antikörper binden, senkt aber in vivo nach parenteraler Injektion den mit ORh-positiven und Orh-negativen Erythrozyten nachweisbaren Antikörpertiter. Eine Deutung dieses Phänomens wurde versucht.

2. Ein PWE aus ORh-positiven Erythrozyten wirkt bei Versuchstieren als Antigen und hemmt in vitro die Hämagglutination von ORh-positiven Erythrozyten durch Rh-Antikörper. PWE aus Orh-negativen Erythrozyten ist in vitro ebenso wirksam. Es wird gezeigt, daß die Wirkung des PWE auf den Rh-Antikörper eine spezifische ist, daß also der PWE die determinante Gruppe der Rh-Substanz enthält. Offenbar enthalten auch rh-negative Erythrozyten den Rh-Rezeptor, jedoch nicht an der Zelloberfläche. Die Rh-Aktivität des PWE nimmt durch Lagerung (selbst bei - 15°) im Laufe von Monaten erheblich ab. Die aktive Komponente des PWE ist schwer wasserlöslich. In Salzsäure ist PWE und damit auch seine aktive Komponente leicht löslich. Durch Dialyse oder Elektrodialyse geht die Rh-Aktivität des PWE nicht verloren, ebensowenig durch Erhitzen auf 100°. Saure Hydrolyse beeinträchtigt die Rh-Aktivität nicht. Einwirkung von Perjodat führt dagegen zum Verlust der Rh-Aktivität des schwerlöslichen PWE-Anteils, während der wasserunlösliche PWE-Anteil, der vorher inaktiv war, durch Perjodat-Behandlung stark Rh-aktiv wird.

3. Durch Untersuchung der hämagglutinationshemmenden Wirkung von Modellsubstanzen im Rh-System wird gezeigt, daß aufgrund dieser Hemmversuche keine Analogieschlüsse auf die chemische Wirkgruppe der Rh-Substanz erlaubt sind.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. AMINOFF, D., W. T. J. MORGAN, W. M. WATKINS (1950)
Studies In Immunochemistry. 8. The Isolation And Properties Of The Human Blood Group-A-Substance.
Biochem. J. 46, 426-438

2. ANNISON, E. F., W. T. J. MORGAN (1952)
The Isolation And Properties Of Lewis Le^a Human Blood-Group Substance.
Biochem. J. 50, 460-471

3. BELKIN, R., A. WIENER (1944)
Demonstration Of The Properties ABMN And Rh In Red-Cell-Stromata.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 56, 214-217

4. BIGLEY, N. Y., R. W. CHANDLER, M. T. DODD (1958)
Inhibition Of Rh_o (D) Antibody By Eluates From Rh_o (D) Erythrocytes, Treated With Mumps Virus Or The Periodate Ion.
J. Immun. 80, 85-93

5. BLOOR, W. R. (1929)
The Oxydative Determination Of Phospholipid (Lecithin And Cephalin) In Blood And Tissues.
J. Biol. Chem. 82, 273-286

6. BOEHM, P., ST. DAUBER, L. BAUMEISTER (1954)
Über Neuraminsäure, ihr Vorkommen und ihre Bestimmung im Serum.
Klin. Wschr. 32, 289-294

7. BOGUTH, W. (1950)
Ein Mikropipettiergerät.
Z. Physiol. Chem. 285, 93-96

8. BOORMANN, K. E., B. E. DODD (1943)
The Group-Specific Substances ABMNRh. Their Occurance In Tissues And Bodyfluids.
J. Path. Bact. 55, 329-331

9. BOYD, W. C. (1959)
Specific Inhibition Of Anti Rh Serum By "Unnatural" Shugars.
Nature 184, 989-990

10. BOYD, W. C. (1960)
The Specifity Of The Nonspecific.
J. Immun. 85, 221-229

11. BOYD, W. C. (1961)
Specific Inhibition Of Anti-D-Antibody By Colominic Acid.
Nature 191, 511

12. BRAHN, B., F. SCHIFF (1926)
Über die komplexe Natur der Blutgruppensubstanz A des Menschen.
Klin. Wschr. 5, 1455-1456

13. CALVIN, M., R. S. EVANS, V. BEHRENDT, G. CALVIN (1946)
Rh Antigen And Hapten. Nature Of Antigen And Its Isolation
From Erythrocyte Stroma.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 61, 416-419

14. CARTER, B. B. (1949)
Rh-Hapten, Its Preparation, Assay, And Nature.
J. Immun. 61, 79-88

15. CARTER, B. B. (1951)
Preparation And Assay Of A Red Cell Fraktion Of The Rh-Factor.
Amer. J. Clin. Path. 21, 561-565

16. COFFIN, S. F., M. M. PICKLES (1953)
The Ability Of Trypsin To Restore Specific Agglutinating
Capacity Of Erythrocytes Treated With Periodate.
J. Immun. 71, 177-182

17. COOMBS, R. R. A. (1962)
Persönl. Mitt.

18. CRAMER, F. (1953)
Papierchromatographie, 2. Aufl., S. 55 u. 69, Verlag Chemie,
Weinheim.

19. CREDITOR, M. C. (1953)
Quantitative Bestimmung von Hämoglobin im Plasma mit der Benzidinreaktion.
in: K. HINSBERG, K. LANG: Medizinische Chemie, Urban und Schwarzenberg, Berlin, München, Wien (1957)

20. DAHR, P. (1948)
Vorschlag zur Verhütung der Neugeborenen Erythroblastose.
Klin. Wschr. 26 (1948), 442-443

21. DAHR, P., H. KNUEPPEL (1945)
Über einige Erfahrungen bei der Gewinnung von Testserum für das erbliche Blutkörperchenmerkmal "Rh".
Z. Immun. Allergieforsch. 105, 118-124

22. DOERDELMANN, P., W. BOCK (1960)
Influence Of Resochin On The Rh-Antigen-Antibody-Reaction In Vitro.
Klin. Wschr. 38, 877-878

23. DODD, M. C. (1963)
Further Observations On The Serologic Specificity Of Sialic Acid For Rh_o(D) Antibody.
J. Immun. 90, 518-525

24. DODD, M. C., N. J. BIGLEY, V. B. GEYER (1960)
Specific Inhibition Of Rh_o(D) Antibody By Sialic Acids.
Science 132, 1398-1399

25. DYER, J. R. (1956)
Use Of Periodate Oxidations In Biochemical Analysis.
Methods in Biochem. Anal., Vol. 3, 111-152

26. EGGE, H. (1963)
Aminosugars. In: Comprehensive, Biochemistry, Carbohydrates.
Elsevier, Amsterdam, London, New York, 1963.

27. ELSON, L. A., W. T. J. MORGAN (1933)
A Colorimetric Method For The Determination Of Glukosamine And Chondrosamine.
Biochem. J. 27, 1824-1828

28. GLEMSER, O., W. DAUTZENBERG (1952)
Zur colorimetrischen Bestimmung des Mg mit Titangelb.
Z. Analyt. Chem. 136, 254-261

29. GRABAR, P. (1964)
Persönl. Mitt.

30. HACKEL, E. (1960)
Effect Of Ribonuclease On Erythrocyte Antigens.
Nature 187, 1036

31. HACKEL, E., R. E. SMOLKER, S. A. FENSKE (1958)
Inhibition Of Anti-Rh And Anti-Lutheran Sera By Ribonucleic Acid Derivatives.
Vox. Sang. 3, 402-408

32. HACKEL, E., K. S. SPOLYAR (1960)
Anti-c And Anti-e Inhibition By Ribonucleic Acid Derivatives.
Vox. Sang. 5, 517-522

33. HAKOMORI, S. J., R. W. JEANLOZ (1961)
Isolation And Characterization Of Glycolipids From Erythrocytes Of Human Blood A (Plus) And B (Plus).
J. Biol. Chem. 236, 2827-2834

34. HALLAUER, C. (1934)
Weitere Versuche zur Isolierung wasserlöslicher Gruppenstoffe aus menschlichen Erythrozyten.
Z. Immun. Allergieforsch. 83, 114-123

35. HEAD, F. S. H. (1952)
Trans. Textile Inst. 43, 1; zit. nach Methods In Carbohydrate Chemistry, II, S. 165

36. HEIDELBERGER, M. (1958)
All Polysaccharides Are Immunologically Specific.
IVth Int. Congr. Of Biochem., Wien

37. HOWE, C. (1951)
The Influenza Virus Receptor And Blood Group Antigens Of Human Erythrocyte Stroma.
J. Immun. 66, 9-35

38. HOWE, C., R. RUSTIGAN (1950)
Studies With The Rh_o(D) Antigen.
J. Immun. 64, 505-513

39. HUMMEL, K. (1952)
Über das Verhalten kompletter und inkompletter Agglutinine im Verlauf der Immunisierung (Vorbehandlung) von Kaninchen mit Menschenserum.
Z. Immun. Allergieforsch. 109, 124-133

40. JEANNET, M., A. HAESSIG (1964)
Über die Beziehung der Hämagglutination im kolloidalen Milieu zur Geldrollenbildung, Blutkörperchensenkung und Sphärocytose.
Blut 10, 297-305

41. KLENK, E. (1960)
Zur Biochemie der Hämagglutination.
Angew. Chem. 72, 482-484

42. KLENK, E., F. LEUPOLD (1944)
Über eine vereinfachte Methode zur Darstellung von phosphorfreien Cerebrosiden und über die als Spaltprodukte auftretenden Fettsäuren.
Z. Physiol. Chem. 281, 208-211

43. KLENK, E., K. LAUENSTEIN (1951)
Über die zuckerhaltigen Formbestandteile des menschlichen Blutes.
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem. 288, 220-228

44. KLENK, E., G. UHLENBRUCK (1960)
Über neuraminsäurehaltige Mucoide aus Menscherythrozytenstroma, ein Beitrag zur Chemie der Agglutinogene.
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem. 319, 151-160

45. KOUT, H., Z. KUBICKOVA (1959)
Influence Of Streptomycin Solutions On The Interaction Between The Agglutinating Sera And The Corresponding Red Blood Cell Receptors.
Nature 184, 639

46. LANDOIS, L. (1875)
Die Transfusion des Blutes, Vogel, Leipzig.

47. LANDSTEINER, K. (1900)
Zur Kenntnis der antifermentativen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe.
Zbl. Bakt. (Orig.) 27, 357

48. LANDSTEINER, K. (1946)
The Specificity Of Serological Reactions.
Harvard University Press

49. LANDSTEINER, K., P. LEVINE (1927)
A New Agglutinable Factor Differentiating Individual Human Bloods.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 24, 600-602

50. LANDSTEINER, K., A. S. WIENER (1940)
An Agglutinable Factor In Human Blood Recognized By Immunsera For Rhesus Blood.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 43, 223

51. LEVINE, P., R. E. STETSON (1939)
An Unusual Case Of Intragroup Agglutination.
J. Amer. Med. Assoc. 113, 126-127

52. LEVINE, P., M. CELANO, R. FENICHEL, W. POLLACK, H. SINGHER (1961 a)
A "D-Like" Antigen In Rhesus Red Blood Cells And In Rh Positive And In Rh-Negative Red Cells.
Science 133, 332-333

53. LEVINE, P., M. CELANO, R. FENICHEL, W. POLLACK, H. SINGHER (1961 b)
A "D-Like" Antigen In Rhesus Monkey, In Human Rh Positive And Rh Negative Red Cells.
J. Immun. 87, 747-752

54. LUEDERITZ, O., O. WESTPHAL, E. EICHENBERGER, E. NETER (1958)
Über die Komplexbildung von bakteriellen Lipopolysacchariden mit Proteinen und Lipoiden.
Biochem. Z. 330 21-33

55. MÁJSKÝ, A., M. KŘEČKOVÁ, R. ZIKOVÁ (1962)
II Untersuchungen über die Rh-Spezifität der Hetero-Immunantikörper von Meerschweinchen, immunisiert mit Extrakten aus menschlichen D (Rh_o)-positiven und negativen Erythrozyten.
Z. Immun. Allergieforsch. 124, 120-132

56. MÁJSKÝ, A., M. MACHÁČKOVÁ (1964)
Über die Bildung von Anti-D (Rh_o)-Antikörpern bei Meerschweinchen.
Z. Immun. Allergieforsch. 127, 129-138

57. MORGAN, W. T. J. (1943)
An Artificial Antigen With Blood Group A Substance.
Brit. J. Exp. Path. 24, 41-49

58. MORGAN, W. T. J. (1959)
Chemische Grundlagen der menschlichen Blutgruppenspezifität.
Naturwissenschaften 46, 181-195

59. MORGAN, W. T. J., W. M. WATKINS (1951)
The Inactivation Of The Blood Group Receptors On The Human Erythrocyte Surface By The Periodate Ion.
Brit. J. Exp. Path. 32, 34-48

60. MOSKOWITZ, M., W. B. DANDLIKER, M. CALVIN, R. S. EVANS (1950)
Studies On The Antigens Of Human Red Cells.
I The Separation From Human Erythrocytes Of A Water Soluble Fraktion Containing The Rh A And B Factors.
J. Immun. 65, 383-392

61. MOSKOWITZ, M., H. P. TREFFERS (1950)
An Agglutinin In Normal Sera For Periodate-treated Red Cells.
Science 111, 717-718

62. MURRAY, J. (1952)
Rh-Antigens Of Human And Monkey Blood.
J. Immun. 68, 513-521

63. MURRAY, J. (1961)
The Structure Of Rh-Antigen.
Proc. 8th Congr. European Soc. Haematology, Vienna 1961,
Verl. S. Karger, Basel, 1962

64. MURRAY, J., E. C. CLARK (1952)
Production Of Anti-Rh In Guinea Pigs From Human Erythrocyte Extracts.
Nature 169, 886-887

65. NETER, E. (1956)
Bacterial Hemagglutination And Hemolysis.
Bact. Rev. 20, 166-188

66. OUCHTERLONY, Ö. (1958)
Diffusion-in-Gel-Methods For Immunological Analysis I.
Progr. Allerg. 5, 1-78

67. PIROFSKY, B., M. S. CORDOVA, D. RIGAS (1964)
The Mechanism Of Streptomycin Inhibition Of Erythrocyte Antibodies.
Vox Sang. 9, 653-663

68. PRICE, C. C., D. H. READ, T. J. BARDOS, J. CHEN (1948)
The Isolation Of A Substance With Rh-Hapten Activity.
J. Amer. Chem. Soc. 70, 3527-3528

69. PROKOP, O. (1951)
Immunantikörpertitersenkung durch Lezithin.
Z. Immun. Allergieforsch. 108, 245-252

70. RACE, R. R., R. SANGER
Die Blutgruppen des Menschen.
Thieme, Stuttgart 1958

71. RADIN, N. S., F. B. LAVIN, J. R. BROWN (1955)
Determination Of Cerebrosides.
J. Biol. Chem. 217, 789-796

72. RAPPORT, M. M. (1961)
Structure And Specifity Of The Lipid Haptens Of Animal Cells.
J. Lipid. Res. 2, 25-36

73. RASCH, L. H.
Lehrbuch der Blutgruppenkunde.
de Gruyter, Berlin 1954

74. ROY, M. N., J. B. CHATTERJEA (1962)
Observations On The Presence Of Rh-Substances In Body Fluids.
Bibl. Haemat. 13, 246-250

75. SIEGERT, R., W. SPIELMANN (1950)
Gewinnung von Rh-Haptenen aus menschlichem Blut und Urin.
Z. Ges. Exp. Med. 115, 491-502

76. SOMOGYI, I. M. (1937)
A Reagent For The Copper-Iodometric Determination Of Very Small Amounts Of Sugar.
J. Biol. Chem. 117, 771-776

77. TEORELL, T. (1931)
Spektrophotometrische Mikrobestimmung des Phosphors.
Biochem. Z. 230, 1-9

78. THIELE, O. W. (1961)
Zur Biochemie des Rh-Faktors und Prophylaxe der fetalen Erythroblastose.
Klin. Wschr. 39, 654

79. THIELE, O. W., B. URBASCHEK (1962)
Investigation Of Blood Group Lipid Haptens.
Biochem. J. 84, 100 P

80. URBASCHEK, B. (1960)
Ein Beitrag zur Kenntnis menschlicher Anti-Rh-Seren.
I. Das Verhalten von Schaferythrozyten.
Z. Immun. Allergieforsch. 120, 145-152

81. URBASCHEK, B. (1961)
Occurence Of An Rh-Like Antigen In Red Cells Of The Sheep.
Nature 191, 193-194

82. URBASCHEK, B. (1964)
Effect Of Phenol-Waterextracts From Human Erythrocytes On The Rh-System.
Nature 202, 1015-1016

83. URBASCHEK, B., O. W. THIELE, I. GRUNDKE, O. PREISLER (1963)
Über das Verhalten von Erythrozytenlipiden im Rh-System.
Naturwissenschaften, 50, 229-230

84. URBASCHEK, B., O. W. THIELE, (1964)
Über Lipidextrakte aus menschlichen Erythrozyten mit Beziehung zu Rh-Antikörpern. I. Gewinnung der Lipide und ihre serologische Prüfung.
Z. Immun. Allergieforsch. 126, 280-295

85. URBASCHEK, B., O. W. THIELE, O. PREILER (1961)
Über einen Lipidextrakt aus menschlichen Erythrozyten, der bestimmte Antikörperfraktionen bei sensibilisierten rh-negativen Frauen bindet.
Zbl. Bakt. 179, 366

86. URBASCHEK, B., O. W. THIELE, O. PREISLER, U. HERLYN, E. GALLASCH
Unveröffentl. Erg.

87. WESTPHAL, O., O. LUEDERITZ, F. BISTER (1952 a)
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenolwasser.
Z. Naturforsch. 7b, 148-155

88. WESTPHAL, O., O. LUEDERITZ, E. EICHENBERGER, W. KEIDERLING (1952 b)
Über bakterielle Reizstoffe.
I. Mitteilung: Reindarstellung eines Polysaccharid Pyrogens aus Bakterium coli.
Z. Naturforsch. 7b, 536-548

89. WITEBSKY, E., J. F. MOHN (1945)
Investigations On Occurance Of Rh-Substances In Amniotic Fluid.
J. Exp. Med. 82, 143-156

90. WITEBSKY, E., J. F. MOHN, D. J. HOWLES, H. M. WARD (1946)
A Simple Method For The Concentration Of Rh-Agglutinins.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 61, 1-5

91. YAMAKAWA, T., T. IIDA (1953)
Immunochemical Study On The Red Blood Cells. I. (Globuside, As The Agglutinogen Of The ABO-System On Erythrocytes).
Jap. J. Exp. Med. 23, 327

92. YAMAKAWA, Y., M. MATSUMOTO, S. SUZUKI, T. IIDA (1956)
Glycolipid As ABO-Blood Group Antigen.
Proc. Internat. Genet. Sympos. 616

93. YAMAKAWA, T., R. IRIE (1960)
On The Mucolipid Nature Of ABO-Group Substance of Erythrocytes.
J. Biochem. (Tokyo) 48, 919-920

94. YOKOYAMA, M., E. G. TRAMS, R. O. BRADY (1963)
Immunochemical Studies With Gangliosides.
J. Immun. 90, 372-380

An dieser Stelle möchte ich vor allem Herrn Professor Dr. med. Dipl.-Chem. O. W. Thiele, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Göttingen, danken für die Überlassung des Themas und seine stets hilfsbereite Unterstützung und Belehrung bei den Problemen und Schwierigkeiten dieser Arbeit sowie für zahlreiche Anregungen, die ich durch Diskussionen mit ihm erhielt. Durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Professor Dr. med. H. J. Deuticke, dem Direktor des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität, wurde es mir ermöglicht, in seinem Hause die Arbeiten zu dieser Dissertation durchzuführen. Hierfür, für wertvolle Ratschläge bei deren Durchsicht sowie für wohlwollende Hilfsbereitschaft bin ich ihm sehr zu Dank verpflichtet. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. E. Gallasch, Blutgruppenlaboratorium des Hygiene-Institutes der Universität Göttingen, und Herrn Dr. med. vet. B. Urbaschek, früher Tierhygienisches Institut in Freiburg i. Br., die mich in die Technik und Problematik der Blutgruppenserologie einführten. Herrn Dr. B. Urbaschek möchte ich außerdem danken für die großzügige Überlassung von einigen Phenolwasserextrakten aus menschlichen Erythrozyten verschiedener Blutgruppenzugehörigkeit sowie für viele interessante Diskussionen. Herrn Professor Dr. med. H. Brandis, Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Göttingen, möchte ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes danken. Herrn Professor Dr. rer. nat. G. Birukow, dem Direktor des I. Zoologischen Institutes der Universität Göttingen, danke ich für sein Interesse und die freundliche Übernahme des Referates. Die Arbeit wurde aus Mitteln des Landes Niedersachsen unterstützt, wofür ich an dieser Stelle danken möchte. Ebenso möchte ich den Blutspendezentralen in Rotenburg (Hannover) und Springe (Deister) für die Überlassung großer Mengen deplasmierten Erythrozytensedimentes danken.

LEBENSLAUF

Am 20. Juli 1937 wurde ich, Inge Grundke, als Tochter des Kaufmannes Ernst Grundke und seiner Ehefrau Lieselotte Grundke geb. Stahlschmidt in Osnabrück geboren.

Vom Herbst 1943 bis Ostern 1948 ging ich zunächst in Meppen und später in Osnabrück auf die Volksschule, wo ich anschließend das Neusprachliche Gymnasium für Mädchen besuchte. Dort legte ich Ostern 1957 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1957 begann ich an der Philipps-Universität Marburg das Studium der Biologie, welches ich seit dem Wintersemester 1959/60 an der Georg-August-Universität Göttingen fortsetzte. Ostern 1961 begann ich neben der Fortführung meines Studiums am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Göttingen mit den experimentellen Vorbereitungen für die vorliegende Dissertation.

BAMBERGER FOTODRUCK · Rudolf Rodenbusch